

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Volk

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hauke Rensing

# **Einfluss eines TNF- $\beta$ Polymorphismus auf die postoperative Zytokinantwort nach extrakorporaler Zirkulation**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Sebastian Allgäuer

geboren am: 19.08.1979 in Ostfildern-Ruit

Dekan: Prof. Dr. med. M.D. Menger

Gutachter: 1.  
2.  
3.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	3
1.2 ABSTRACT.....	5
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
2.2 DIE BEGRIFFE SEPSIS UND SIRS.....	7
2.2.1 DEFINITIONEN .....	9
2.2.2 DAS PIRO MODELL .....	10
2.3 SIRS ALS FOLGE KARDIOCHIRURGISCHER OPERATIONEN .....	11
2.3.1 ENDOTOXIN UND DIE ENTZÜNDUNGSREAKTION NACH HERZCHIRURGISCHEN EINGRIFFEN .....	13
2.4 DIE ROLLE VON ZYTOKINEN BEI DER ENTZÜNDUNGSREAKTION .....	15
2.4.1 TUMOR NEKROSE FAKTOR $\alpha$ .....	16
2.4.2 INTERLEUKIN 6.....	16
2.4.3 INTERLEUKIN 10.....	17
2.5 GENETISCHE POLYMORPHISMEN BEI SEPSIS UND SIRS .....	17
2.5.1 DER TNF- $\beta$ NcoI POLYMORPHISMUS .....	18
2.6 FRAGESTELLUNG.....	21
<b>3. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>22</b>
3.1 PATIENTEN .....	22
3.1.1 EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN .....	22
3.2 ANÄSTHESIE .....	23
3.2.1 PRÄMEDIKATION UND NARKOSEEINLEITUNG .....	23
3.2.2 NARKOSEFÜHRUNG .....	23
3.2.3 FLÜSSIGKEITS- UND ELEKTROLYTSUBSTITUTION .....	24
3.3 HERZ-LUNGEN-MASCHINE.....	24
3.3.1 FÜLLUNG DER HERZ-LUNGENMASCHINE .....	24
3.3.2 EXTRAKORPORALE ZIRKULATION .....	25
3.3.3 ORGANPROTEKTION .....	25
3.4 STUDIENAUFBAU .....	26
3.5 LABORMATERIALIEN .....	27
3.6 VOLLBLUTANSATZ .....	27
3.7 ZYTOKINBESTIMMUNG .....	27
3.8 BESTIMMUNG DES GENOTYPS MITTELS PCR UND GELELEKTROPHORESE .....	30
3.8.1 AUFARBEITUNG DER DNA .....	30
3.8.2 AMPLIFIZIERUNG DER DNA MITTELS PCR.....	31
3.8.3 BESTIMMUNG DES RFLP MITTELS NcoI VERDAU .....	32
3.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	34
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
4.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN UND GENOTYPISIERUNG .....	35
4.1.1 CHARAKTERISTIKA DER STUDIENGRUPPE .....	35
4.1.2 GENOTYPVERTEILUNG UND ALLELFREQUENZ.....	36
4.1.3 VERGLEICH DER DEMOGRAPHISCHEN DATEN.....	36
4.2. ZYTOKINANTWORT IM GESAMTKOLLEKTIV .....	36
4.2.1 UNSTIMULIERTE ZYTOKINANTWORT.....	36
4.2.2 ZYTOKINANTWORT NACH ENDOTOXINSTIMULATION .....	38
4.3. EINFLUSS DES NcoI RFLP IM TNF- $\beta$ GEN AUF DIE SPONTANE UND LPS – STIMULIERTE ZYTOKINFREISETZUNG VOR UND NACH AORTOKORONARER BYPASSOPERATION .....	39
4.3.1 TNF- $\alpha$ .....	39
4.3.2 IL-10 .....	41
4.3.3 IL-6.....	44
4.4 EINZELVERLÄUFE NACH LPS STIMULATION .....	46

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
5.1 STUDIENZIEL .....	47
5.2 KRITISCHE BEWERTUNG DER METHODIK .....	47
5.2.1 PATIENTENKOLLEKTIV .....	47
5.2.2 DEMOGRAPHISCHE DATEN .....	48
5.2.3 MESSZEITPUNKTE .....	49
5.2.4 MESSMETHODIK .....	50
5.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	52
5.3.1 UNSTIMULIERTE PROBEN .....	52
5.3.2 STIMULIERTE PROBEN .....	52
5.3.3 DER EINFLUSS DES TNF- $\beta$ NCOI POLYMORPHISMUS AUF DIE TNF- $\alpha$ AUSSCHÜTTUNG NACH LPS-STIMULATION .....	53
5.3.4 DER EINFLUSS DES TNF- $\beta$ NCOI POLYMORPHISMUS AUF DIE IL-10 AUSSCHÜTTUNG NACH LPS-STIMULATION .....	54
5.3.5 DER EINFLUSS DES TNF- $\beta$ NCOI POLYMORPHISMUS AUF DIE IL-6 AUSSCHÜTTUNG NACH LPS-STIMULATION .....	55
5.3.6 AUSREIßER .....	55
5.4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE IM KONTEXT DER AKTUELLEN DATENLAGE .....	56
5.4 SCHLUSSFOLGERUNG .....	57
5.6 AUSBLICK .....	58
<b>6. LITERATUR .....</b>	<b>60</b>
<b>7. DANK .....</b>	<b>70</b>
<b>8. LEBENS LAUF .....</b>	<b>71</b>

## **1. ZUSAMMENFASSUNG**

### **1.1 Zusammenfassung**

Die extrakorporale Zirkulation ist ein Standardverfahren bei herzchirurgischen Eingriffen. Postoperativ kann es durch den Blutkontakt mit Fremdoberflächen der Herz-Lungenmaschine, das Ischämie-Reperfusionseignis und eine Endotoxinämie zu einer systemisch-inflammatorischen Reaktion (engl.: systemic inflammatory response syndrom, kurz: SIRS) kommen. Eine wichtige Rolle bei deren Entwicklung spielen Zytokine wie u.a. TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6. Andererseits kommt es durch die extrakorporale Zirkulation zu einer transienten Hemmung der Zytokinsynthesefähigkeit von in vitro stimulierten Monozyten im Vollblutansatz. Sowohl eine überschießende Immunantwort als auch eine Immunparalyse können potentiell zu einem verzögerten postoperativen Heilungsprozess und über ein SIRS zum Multiorganversagen führen.

Im letzten Jahrzehnt wurden verschiedene Polymorphismen in den Genen einzelner Zytokine beschrieben und deren Einfluss auf die Zytokinausschüttung und das klinische Outcome insbesondere bei Sepsispatienten untersucht. Ziel verschiedener Untersuchungen ist es, im Sinne des PIRO-Konzepts, weitere prädisponierende Faktoren zu finden, anhand derer der Verlauf und das Outcome von Sepsispatienten besser beurteilt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus auf die TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 Konzentrationen im Serum und im Endotoxin stimulierten Vollblutansatz bei Patienten vor und nach aortokoronarer Bypassoperation untersucht. Bei 40 Patienten wurden präoperativ (T1), intraoperativ (T2) und 24h postoperativ (T3) Blutproben entnommen und nach dem Vollblutprotokoll nach WILSON et. al. weiterverarbeitet. Die Messung der Zytokine erfolgte mittels ELISA. Die Bestimmung des TNF- $\beta$  Polymorphismus erfolgte mittels PCR und Elektrophorese nach NcoI-Verdau des PCR Produkts. Entsprechend ihres Genotyps wurden die Patienten zur weiteren Auswertung in zwei Gruppen unterteilt (TNF-B1 Allelträger vs. TNF-B2 Homozygote).

Sowohl im Patientenserum als auch in den Endotoxin stimulierten Vollblutansätzen zeigte sich kein Einfluss des TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus auf die TNF- $\alpha$  und IL-6 Antwort vor und nach aortokoronarer Bypassoperation.

Jedoch ergab sich eine, im Vergleich zum Ausgangswert signifikant überschießende IL-10 Synthese 24h postoperativ im Vollblut von TNF-B2 Homozygoten Patienten in vitro.

Insgesamt zeigen die Daten, dass der TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf die endotoxinabhängige Zytokinantwort hat. Die beschriebene Assoziation zwischen erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegeln im Rahmen der Sepsis sowie nach kardiochirurgischen Operationen bei TNF-B2 Homozygoten Patienten ist daher anscheinend Endotoxin unabhängig. So ist bislang nicht klar, ob

der TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus einen Einfluss auf die monozytäre Aktivierung an Fremdoberflächen der Herz-Lungen Maschine oder auch auf die myokardiale Zytokinproduktion hat.

In den letzten 10 Jahren gab es nur wenige, kleine Studien mit geringen Patientenzahlen sowie einzelne Fallberichte, die einen Einfluss des TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus auf die Zytokinausschüttung beim Menschen in vivo und in vitro untersuchten und die Ergebnisse sind kontrovers. Es sind daher weitere große Studien nötig, um eine eindeutige klinische Relevanz einzelner genetischer Polymorphismen zu belegen und vor allem die damit verbunden Mechanismen aufzuklären.

## **1.2 Abstract**

Extracorporeal circulation is a standard procedure in cardiac surgery. Contact of peripheral blood with artificial surfaces, ischemia-reperfusion injury and endotoxemia can induce a postoperative systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Cytokines like TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6 play an important role in the development of SIRS. On the other hand, it has been demonstrated, that extracorporeal circulation leads to a transient deactivation of mononuclear cells in whole blood cultures in vitro. An excessive immune response as well as immunoparalysis can cause a prolongation of postoperative recovery, a SIRS or a multi organ dysfunction syndrome.

In the last decade several genetic polymorphisms in cytokine genes have been described and their impact on cytokine release and on the clinical outcome of septic patients has been investigated. Now, it has to be investigated which factors determine the severity of sepsis and the patients outcome, as described in the PIRO-Concept.

The aim of this study was to determine the impact of a TNF- $\beta$  NcoI Polymorphism on TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 serum levels in LPS stimulated and unstimulated whole blood cultures from patients undergoing aortocoronary bypass grafting. Preoperative (T1), intraoperative (T2) and postoperative (T3) blood samples were taken from 40 patients and processed as described previously by WILSON and coworkers. Cytokine levels were measured with commercial ELISA kits. The TNF- $\beta$  polymorphism was detected with PCR and electrophoresis after NcoI digestion of the PCR product. Depending on the genotype, patients were divided into two groups as (1) Carriers of the TNF-B1 allele or (2) TNF-B2 homozygous.

TNF- $\alpha$  and IL-6 levels from unstimulated as well as from the stimulated whole blood samples measured before and after aortocoronary bypass surgery were not significantly different between the study groups.

However, in the present study significantly higher levels of IL-10 were present in TNF-B2 homozygous patients, 24h postoperatively, compared to preoperative levels in stimulated whole blood cultures.

The data of this study indicate that the TNF- $\beta$  NcoI polymorphism has no significant impact on the endotoxin stimulated cytokine response. Associations between elevated TNF- $\alpha$  levels in septic patients and after aortocoronary bypass grafting as described previously in TNF-B2 homozygous patients may therefore be independent from endotoxin. Actually it has not been investigated if the TNF- $\beta$  NcoI polymorphism is associated with activation of mononuclear cells on artificial surfaces or with the myocardial cytokine production.

In the last ten years only a few studies and at some case reports have described an impact of the TNF- $\beta$  NcoI polymorphism on the human cytokine response and the results are discussed controversial. Therefore larger studies are necessary to point out the clinical relevance of genetic

polymorphisms in the pathogenesis of SIRS and sepsis and to investigate the underlying mechanisms.



## **2. EINLEITUNG**

Seit dem ersten erfolgreichen Einsatz der Herz-Lungenmaschine (HLM) in den 50er Jahren haben sich Operationen am offenen Herzen im Allgemeinen und operative Koronarrevaskularisationen im Speziellen zu Standardeingriffen entwickelt. Derzeit werden in Deutschland jährlich circa 54 000 Koronaroperationen auf einem sehr hohen Qualitätsniveau mit einer perioperativen Letalität von unter 3 % durchgeführt. (HAKE U, 2007).

Der Blutkontakt mit Fremdoberflächen beim Einsatz der HLM und das Ischämie-Reperfusionseignis im Myokard durch das Abklemmen der Aorta sowie die Kardioplegie können allerdings eine systemisch-inflammatorische Reaktion (engl.: systemic inflammatory response syndrom, kurz: SIRS) auslösen. (LAFHEY J, 2002). Die resultierenden Organdysfunktionen tragen entscheidend zur Mortalität und Morbidität koronarchirurgischer Eingriffe bei, wobei ältere Patienten, Diabetiker und Patienten mit eingeschränkter Herz- oder Nierenfunktion oder zerebralen Vorschäden besonders gefährdet sind. In den letzten Jahren ist der Anteil dieser herzchirurgischen Risikopatienten angestiegen und wird voraussichtlich weiter zunehmen.

Die Inzidenz des SIRS nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) wird mit ca. 40% angegeben (TAYLOR K M, 1996). In einer Studie von KOLLEF et. al. kam es bei 11% der Patienten zu einem Multiorganversagen (MODS) nach kardiopulmonalem Bypass, die Mortalität lag dabei bei 41% (KOLLEF M H, 1995).

Faktoren, die das Auftreten, die Schwere und das klinische Outcome des SIRS beeinflussen und die Frage, warum einige Patienten bei scheinbar vergleichbarer Ausgangssituation postoperative, lebensbedrohliche Komplikationen im Sinne eines MODS entwickeln und andere nicht, sind bisher noch nicht vollständig geklärt.

### **2.2 Die Begriffe Sepsis und SIRS**

Das Krankheitsbild der Sepsis ist weltweit eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Patienten, die intensivmedizinisch behandelt werden müssen. Die Erkrankung stellt ein hohes Risiko für irreversibles Organversagen mit tödlichem Verlauf dar und ist derzeit in den USA die 10. häufigste Todesursache (DANAI P, 2005). Eine große epidemiologische Studie zeigte, dass allein im Jahr 1995 in den USA über 750.000 Patienten an einer Sepsis erkrankten, wovon mehr als 210.000 an den Folgen starben (ANGUS D C, 2001). In Deutschland werden jährlich zwischen 76 und 110 Sepsisfälle pro 100 000 erwachsene Einwohner diagnostiziert. Für die

Sepsis beträgt die Prävalenz 12,4% für die schwere Sepsis und den septischen Schock 11,0% (ENGEL C, 2007).

Trotz der naheliegenden Vermutung, dass durch die ständige Weiterentwicklung der operativen und pharmakologischen Therapie und durch die Modernisierung der Intensivmedizin eine Reduktion der Sepsisfälle stattfinden müsste, zeigen aktuelle Daten, dass die Inzidenz der Sepsis in den letzten Jahren zugenommen hat. Auch neue Therapieansätze, wie z. B. der Einsatz von antiinflammatorischen Substanzen und die Weiterentwicklung von Antibiotika hatten keinen Einfluss auf die hohe Mortalität. (DANAI P, 2005; HOTCHKISS R, 2003). Vielmehr kam es von 1993 bis 2005 in den USA zu einer Verdopplung der Hospitalisationsraten von Patienten mit schwerer Sepsis sowie einem signifikanten Anstieg der Mortalität (DOMBROVSKIY V Y, 2007).

Hinzu kommt, dass durch die Fortschritte der Medizin immer mehr ältere, vorerkrankte und immunsupprimierte Patienten auf Intensivstationen behandelt werden, die sich zudem im Bereich der operativen Versorgung immer häufiger Hochrisikoeingriffen wie z.B. kardiochirurgischen Operationen unterziehen.

Somit ist die Sepsis noch immer ein bedrohliches Krankheitsbild, das zudem mit hohen Kosten hinsichtlich menschlicher und ökonomischer Ressourcen einhergeht.

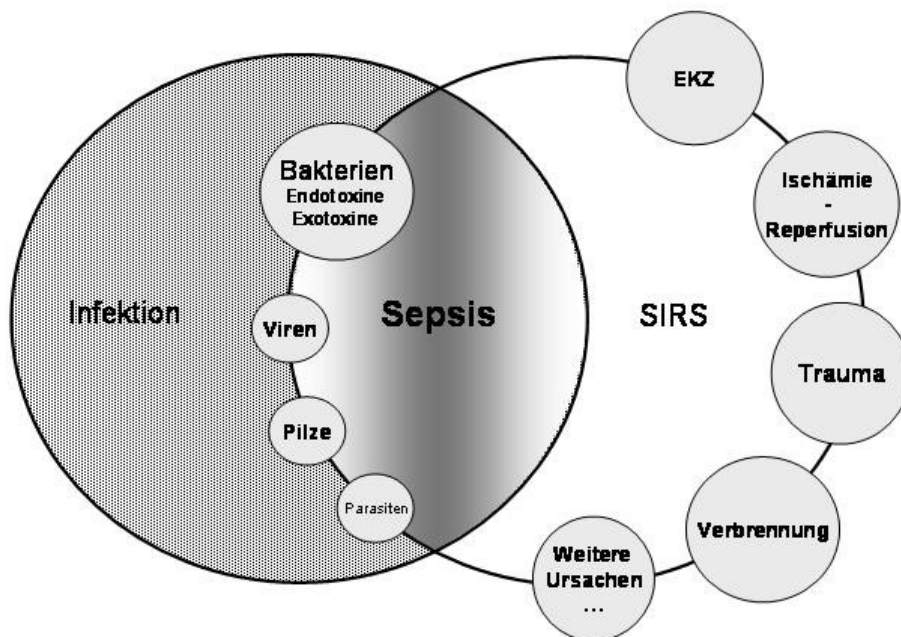


Abb. 2.1: Beziehung zwischen Infektion, Sepsis und SIRS (modifiziert nach BONE R C, 1992)

### 2.2.1 Definitionen

Das klassische klinische Syndrom der Sepsis im Sinne der hämatogenen Generalisation einer Lokalinfection wurde erstmals von Schottmüller 1914 wie folgt definiert: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (SCHOTTMÜLLER H, 1914).

Die zunehmenden Erkenntnisse über die mikrobiologischen, zellulären und humoralen Zusammenhänge führten 1992 dazu, dass in einer Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) einheitliche Definitionen der Sepsis und der damit assoziierten klinischen Syndrome formuliert wurden. Hierbei wurde der Begriff des „systemic inflammatory response syndroms“ (SIRS) geschaffen, der der Erkenntnis Rechnung trägt, dass es viele Parallelen zwischen infektiöser und nicht infektiöser inflammatorischer Antwort gibt (vgl. Abb. 2.1). So können Symptome wie Tachykardie, Tachypnoe, Fieber und Leukozytose auch bei Traumapatienten oder bei Verbrennungsoptionen sowie nach dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen, oder nach Ischämie/Reperfusionseignissen beobachtet werden (WESTABY S, 1987; GELMAN S, 1995; WAXMAN K, 1996).

Das SIRS ist demnach definiert als eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion auf unterschiedliche Noxen und manifestiert sich durch das Auftreten von mindestens zwei der folgenden Symptome (BONE, R.C. 1992):

- Körpertemperatur  $> 38^{\circ}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$ ,
- Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ,
- Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$  oder  $\text{paCO}_2 < 32\text{mmHg}$ , oder Notwendigkeit der maschinellen Beatmung,
- Leukozytenzahl  $> 12.000/\mu\text{l}$  oder  $< 3800/\mu\text{l}$  oder  $> 10\%$  unreife Formen.

Unter dem Begriff Sepsis wird entsprechend eine systemische Reaktion des Organismus verstanden, die dann vorliegt wenn zusätzlich zu einer nachgewiesenen Infektion zwei der oben genannten SIRS-Kriterien erfüllt werden.

Auf dieser Definition aufbauend, definierte SCHUSTER (1996 und 2006) die Sepsis wie folgt: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen

Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“

<b>Infektion:</b>	Nachweis einer pathologischen Besiedlung des Körpers mit Mikroorganismen
<b>Bakteriämie:</b>	Nachweis von lebenden Bakterien im Blut.
<b>Schwere Sepsis:</b>	Sepsis kombiniert mit Organdysfunktionen, die sich z.B. durch einen veränderten mentalen Zustand, eine Oligurie, eine Laktatazidose oder mit einer Hypotension (systolischer Blutdruck <90 mmHg oder Abfall um mehr als 40 mmHg) nachweisen lässt.
<b>Septischer Schock:</b>	Sepsis kombiniert mit volumenrefaktärer Hypotension und Organdysfunktion.
<b>Multiorganversagen:</b>	Kombination mehrerer Organdysfunktionen, die jede für sich unbehandelt eine vitale Bedrohung darstellen. (engl.: multiple organ dysfunction syndrome = MODS).

Tab. 2.1: Weitere Definitionen nach der ACCP/SCCM Konsensuskonferenz 1992 (nach BONE, R.C. 1992)

## 2.2.2 Das PIRO Modell

Etwa 10 Jahre nach Einführung des Begriffes „SIRS“ versuchten Vertreter von ACCP und SCCM sowie von der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), der American Thoracic Society (ATS) und der Surgical Infection Society die bestehenden Definitionen noch einmal zu überarbeiten und anhand der aktuellen Studienlage Wege zu finden, die Diagnose „Sepsis“ in der Zukunft verlässlicher und im klinischen Alltag besser stellen zu können.

Die im Jahr 2003 veröffentlichten Ergebnisse dieser Konferenz führten zur Entwicklung einer Art „Staging-System“, um die Sepsis besser graduieren zu können. Hierzu wurde ein hypothetisches Modell mit dem Namen „PIRO“ vorgeschlagen, das die Wirtsantwort auf eine Infektion besser charakterisieren und ein präziseres Staging erlauben soll (LEVY M M, 2003).

Das Klassifikationsschema PIRO wurde in Anlehnung an das TNM-System zur Tumorklassifikation entwickelt. In ähnlicher Weise sollen dabei Patienten mit Sepsis stratifiziert werden. Hierbei steht P für Prädisposition und I für Infektion bzw. Insult. Für die Art und das Ausmaß der Wirtsantwort steht das R (=Host-Response) und O beschreibt das Ausmaß der resultierenden Organdysfunktion. Dabei handelt es sich bislang jedoch lediglich um ein rudimentäres Konzept, das in der Zukunft getestet und verfeinert werden soll (GERLACH H, 2006). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über das Modell:

---

**Prädisposition:**

- Grunderkrankungen
- Veranlagung (Genetik)

---

**Infektion/Insult:**

- Kultur und Resistenzlage des Keims
- Infektionsherd
- Virulenzfaktoren des Keims
- Bakterientoxine (z.B. LPS)

---

(Host-) **Response**

- SIRS
- Entzündungsmediatoren (TNF, IL-6, CRP, Protein C)

---

**Organdysfunktion**

- Anzahl der gestörten Organsysteme

---

*Tab.2. 2: Überblick über das PIRO – Model (modifiziert nach BARON R M, 2006)*

### **2.3 SIRS als Folge kardiochirurgischer Operationen**

Mit dem Begriff des SIRS lässt sich auch die Entstehung eines septischen Krankheitsbilds nach abakteriellen Traumen, z.B. nach kardiochirurgischen Operationen mit extrakorporaler Zirkulation erklären. Das Ausmaß der Inflammation reicht dabei von einer „milden“, klinisch unauffälligen Erhöhung der Entzündungsparameter im Serum bis hin zu einer schweren, generalisierten Reaktion, die von einer (bakteriellen) Sepsis nicht zu unterscheiden ist und zu einem akuten Lungenversagen (aquired respiratory distress syndrom, kurz: ARDS), einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) oder einem akuten Nierenversagen führen kann (SCHUSTER H P, 2004; SMITH J W, 2006).

Aktuell gibt es verschiedene Blickwinkel, unter denen man die Verbindung zwischen dem Ausmaß der postoperativen Entzündungsantwort und dem unvorhersehbaren klinischen Verlauf sehen kann.

So haben McBBRIDE et al bereits 1995 in einem isolierten Modell der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-8 nachweisen können. Als Ursache für den Anstieg der Zytokine wird die Aktivierung von Zellen des unspezifischen Immunsystems, wie Monozyten und Makrophagen an unphysiologischen Oberflächen angesehen. Aber auch das ischämische Myokard scheint bei der Produktion von TNF- $\alpha$  infolge kardiochirurgischer Operationen eine wichtige Rolle zu spielen (WAN S, 1996; MELDRUM D R, 1998). Dabei korreliert myokardial synthetisiertes TNF- $\alpha$  mit einer Abnahme

der Kontraktilität und der Zunahme der Apoptoserate von Myokardzellen (VAZQUEZ-JIMENES J F, 2002).

Daneben sind auch die antiinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-10 nach EKZ von Bedeutung. Sie haben wahrscheinlich eine modulierende Funktion, können aber im ungünstigen Fall zu einer Immunparalyse führen (ALLEN M L, 2006). So könnte eine durch die EKZ oder durch Traumen induzierte Immunsuppression eine wichtige Rolle bei der Entwicklung infektiöser Komplikationen spielen (TAKAHASHI H, 2004; WAN S, 1996). Neben dem Einfluss der antiinflammatorischen Zytokine konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass es nach EKZ zu einer transienten Hemmung der Zytokinsynthesefähigkeit von in vitro stimuliertem Vollblut kommt. (GRUNDMANN U, 2000).

Zusammengenommen repräsentieren die oben beschriebenen Reaktionen den Versuch des Körpers, wieder eine Homöostase herzustellen. Dieser Versuch kann sich überwiegend „proinflammatorisch“ (SIRS), „antiinflammatorisch“ (CARS = compensatory antiinflammatory response syndrom) oder zusammen als „intermediate mixed response (MARS) manifestieren (BONE R C, 1996). Diese Zusammenhänge sind in Abb. 2.2 zusammengefasst.

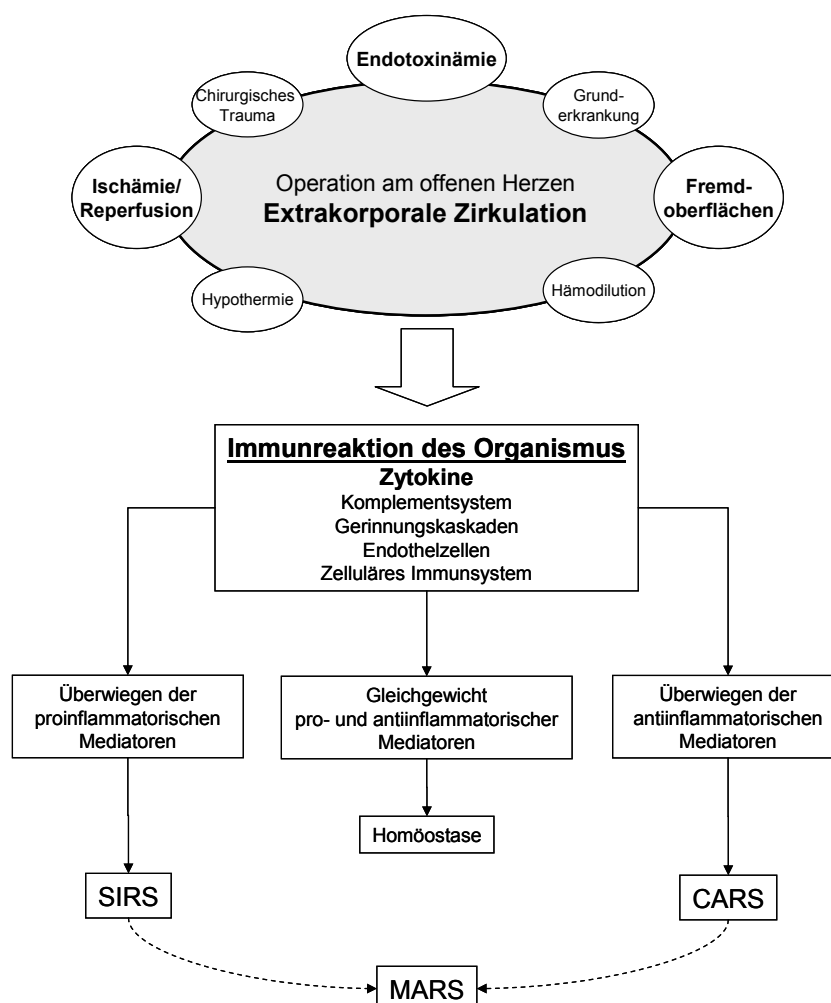


Abb.2.2: Zusammenspiel der Mechanismen und Reaktionen nach EKZ

Darüber hinaus könnte das „multiple-hit“ Modell der Sepsis als Erklärung dienen, das komplizierte postoperative Verläufe als Folge mehrerer Ereignisse postuliert. Hierbei kommt es zuerst zu einer Aktivierung der Immunantwort, nachfolgend führt das Auftreten weiterer Stimuli zu einer inadäquaten, unkontrollierten Reaktion des Immunsystems und somit möglicherweise zu einem MODS (SAADIA R, 1999).

### **2.3.1 Endotoxin und die Entzündungsreaktion nach herzchirurgischen Eingriffen**

Im Allgemeinen sind es, neben Fremdorganismen, Faktoren wie Trauma, Blutverlust, Transfusionen oder Hypothermie, die eine inflammatorische Antwort auslösen können. Im Speziellen führt der Einsatz der Herz-Lungen Maschine im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen zu einer Aktivierung des Immunsystems. Dabei spielen mehrere Faktoren eine ursächliche Rolle: Die Kontaktaktivierung des Immunsystems durch Fremdmaterialien der HLM, das Ischämie-Reperfusionseignis, die Hypothermie, die Gabe von Blutprodukten und vasoaktiven Pharmaka führen zur Aktivierung von Kaskadensystemen. Infolgedessen kommt es zu einer vermehrten Bildung von aktivierten Komplementkomponenten (C3a, C5a), Prostanoiden, Endorphinen, aktivierten Kininen und Zytokinen. (LAFHEY J G, 2002; WAN S, 1997; SABLITZKI A, 2001).

Ein weiterer Faktor, der immer wieder in den Mittelpunkt klinischer Studien rückt, ist die Endotoxinämie.

Endotoxin (oder: Lipopolysaccharid; kurz: LPS) ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und wird nach Zerfall der Keime freigesetzt. Die Folgen einer Endotoxinämie wurden zum ersten Mal 1948 bei Patienten beschrieben, die wegen einer Syphilis mit Penicillin behandelt wurden. Als Folge des rapiden Untergangs der Keime und der daraus resultierenden raschen Endotoxinfreisetzung, entwickelten diese Patienten eine, seither als „Jarisch-Herxheimer Reaktion“ bezeichnete, systemische Entzündungsreaktion (FARMER T W, 1948). Die Rolle der Endotoxinämie in der Pathophysiologie des SIRS nach EKZ ist inzwischen vielfach beschrieben, die Pathogenese bleibt jedoch umstritten: So wurden schon früh mit Endotoxin verunreinigte kardioplegische Lösungen oder Flüssigkeiten aus der HLM als Auslöser eines SIRS nach Aortokoronaren Bypassoperationen (ACB) beschrieben (ANDERSEN L W, 1987). Aber auch Blut, das sich während der OP in der Perikardhöhle sammelt und über den Sauger und die HLM wieder dem Kreislauf zugeführt wird, steht im Verdacht, eine wichtige Quelle der Endotoxinämie zu sein. (SPANIER T, 2000). Auch die Rolle eines Mucosaschadens, der als Folge eines Ischämie-Reperfusionseignisses das Eindringen von Bakterien über den Darm möglich macht, ist mehrfach beschrieben. Eine prophylaktische, präoperative Darmdekontamination scheint

jedoch keinen Effekt auf die postoperative Endotoxinämie zu haben (YU J, 2007; BOUTER H, 2002).

Die Immunreaktion des Wirtes auf Endotoxin ist von einem in der Leber synthetisierten „LPS-bindenden Protein“ (LBP) abhängig (BEUTLER B, 2001). Erst der LPS-LBP-Komplex ist in der Lage, mit dem CD-14 Oberflächenrezeptor zirkulierender Monozyten oder gewebeständiger Makrophagen zu interagieren. (WRIGHT S D, 1990). Aber auch CD-14 negative Zellen wie dendritische Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen sind durch LPS stimulierbar. Dies geschieht mithilfe eines löslichen Rezeptors: Dieser lösliche sCD-14- Rezeptor lässt sich im Serum gesunder Individuen nachweisen und seine Serumspiegel steigen bei Sepsispatienten an (LANDMANN R, 1996).

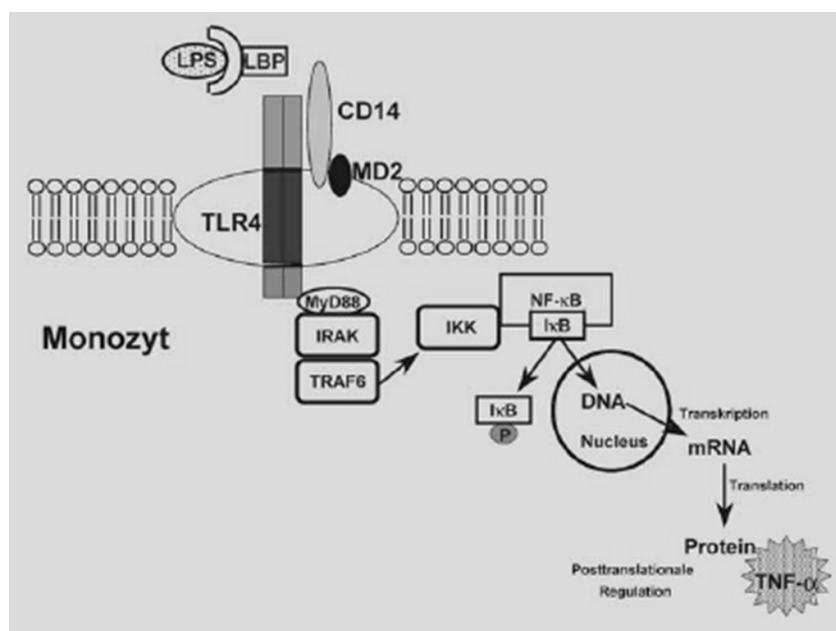


Abb. 2.3: Signaltransduktion im Monozyten. (mit freundlicher Genehmigung von RENSING H)

Da CD-14 keinen intrazellulären Anteil hat, wird zur Initiierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade noch ein weiterer Bestandteil benötigt: nach Bindung des LPS/LBP-Komplexes an den CD14-Rezeptor kommt es zu einer Aggregation des CD14-Rezeptors mit einem Adapterprotein (MD2) und dem Toll-like-Rezeptor (TLR) 4. Dieser transmembranöse TLR-4 – MD2 – Komplex vermittelt die Wirkung des Toxins, indem er über eine Aktivierung der intrazellulären Proteintyrosinkinase (PTK) die Signaltransduktion in Gang setzt, was letztlich zur Phosphorylierung einer inhibitorischen Untereinheit (IκB) des Transkriptionsfaktors „nukleärer Faktor kappa B (NFκB)“ führt. Der dadurch aktivierte Transkriptionsfaktor initiiert seinerseits die Genexpression wichtiger Zytokine z.B. TNF-α oder IL-6 (RENSING H, 1998).

In weiteren Studien wurde zusätzlich eine CD-14-unabhängige Wirkung von LPS auf mononukleäre Zellen beschrieben. Die intrazellulären Proteine NOD1 und NOD2 (nucleotid-



binding-oligomerization domain) scheinen die Fähigkeit zu haben, LPS zu binden und zur LPS induzierten Zytokinantwort beizutragen. Dies lässt vermuten, dass es noch andere Wege der Zelle gibt, auf einen bakteriellen Reiz zu reagieren (INOHARA N, 2002).

## **2.4 Die Rolle von Zytokinen bei der Entzündungsreaktion**

Zytokine sind pluripotente Peptidmediatoren mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 40.000 Dalton. Produziert werden sie vor allem von Monozyten/Makrophagen und polymorphkernigen Lymphozyten (PMN), weswegen sie auch als Monokine oder Lymphokine bezeichnet werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass beinahe jede kernhaltige Zelle in der Lage ist, Zytokine zu produzieren bzw. auf sie zu reagieren. Dabei stehen vor allem Endothel- und Organparenchymzellen im Mittelpunkt des Interesses. So konnte MELDRUM et. al. (2003) zeigen, dass es im Rahmen von aortokoronaren Bypassoperationen und EKZ zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B in Myokardzellen mit einem konsekutiven Anstieg von TNF- $\alpha$  kommen kann.

Zytokine spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation zellulärer und humoraler Immunreaktionen und leisten dabei einen wichtigen Beitrag zur Zell-Zell-Kommunikation.

Anhand funktioneller Gesichtspunkte kann man Zytokine in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilen, je nachdem welche Rolle sie im Entzündungsgeschehen spielen.

So ist die frühe Phase einer Entzündungsreaktion vor allem durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 gekennzeichnet. Diese werden nach Aktivierung von Monozyten/Makrophagen als sog. „proximale“ oder „Alarmzytokine“ ausgeschüttet und setzen ihrerseits die Synthese weiterer „distaler“ Zytokine wie IL-6 und IL-8 in Gang. (RENSING H, 2001). Obwohl eine direkte Korrelation zwischen Serum-Zytokinkonzentrationen und schlechtem postoperativem Verlauf bislang nicht nachgewiesen werden konnte, ließen sich doch bei Patienten, die nach einem operativen Eingriff ein SIRS entwickelten, signifikant höhere Zytokinspiegel nachweisen als bei Patienten mit komplikationslosem postoperativem Verlauf (BRUZOTTA F, 2001; SABLITZKI A, 2001).

Neben der proinflammatorischen Zytokinantwort kommt es auch zur Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine als Gegengewicht. Dabei sind im besonderen IL-10, Interleukin-1-rezeptorantagonist (IL-1ra) und die löslichen TNF- $\alpha$  Rezeptoren 1 und 2 zu erwähnen. IL-10 ist dabei ein potenter Inhibitor der Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-6 u.a. (ALLEN M L, 2006). Die komplette Bedeutung dieser antiinflammatorischen Komponente ist noch nicht vollständig klar, es wird jedoch vermutet, dass die Prognose z.B. nach koronarchirurgischen Eingriffen auch von einer Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Zytokinantwort abhängt.

### 2.4.1 Tumor Nekrose Faktor $\alpha$

Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein 17kD großes Protein. Sein Genlokus befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und ist ca. 3000 Basenpaare lang. In unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich der Genlokus für TNF- $\beta$  (NEDWIN G E, 1985).

Nach seiner Translation wird TNF- $\alpha$  zunächst als 26kD großes Membranprotein exprimiert. Aus diesem wird der eigentlich aktive Anteil durch eine Metalloproteinase freigesetzt und bindet dann als Trimer auf der Oberfläche seiner Zielzellen an spezifischen Rezeptoren (SMITH R A, 1987). Dabei sind zwei Rezeptormoleküle bekannt: TNF-R1 mit einem Molekulargewicht von 55kD und TNF-R2 mit einem Molekulargewicht von 70-80kD (ENGELMANN H, 1990). Diese beiden Rezeptoren existieren sowohl in einer membranständigen Form als auch als lösliche Rezeptoren (sTNF-R) deren Funktion die Bindung und Inaktivierung von TNF- $\alpha$  ist und die für dessen kurze Halbwertszeit von 20min in vivo mit verantwortlich sind (PESCHON J J, 1998; JAWA R S, 2006).

Beinahe jede Zelle kann durch TNF- $\alpha$  beeinflusst werden und auch in seiner Wirkung ist es sehr vielfältig. Es führt zur Freisetzung einer Vielzahl weiterer Zytokine (u.a. IL-6), Eicosanoiden, Glukokortikoiden und Adhäsionsmolekülen. Weiter gehört die Aktivierung der Blutgerinnung zu den TNF- $\alpha$  Wirkungen, ebenso wie die Steigerung des Muskelkatabolismus und eine Kachexie induzierende Wirkung, weswegen es gelegentlich auch als Kachexin bezeichnet wird.

### 2.4.2 Interleukin 6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein lösliches Polypeptid aus 184 Aminosäuren, das aus einem Vorläufermolekül von 212 Aminosäuren gebildet wird.

Man kennt aktuell fünf verschiedene Formen von IL-6, die durch posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung) entstehen und sich daher auch in ihrer Masse (21,5-28kD) unterscheiden.

IL-6 wird v.a. von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen gebildet. Die Induktion der IL-6 Synthese erfolgt durch LPS, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ .

Ein Merkmal dieses Zytokins ist seine Beteiligung an vielen verschiedenen biologischen Prozessen. Es wirkt auf periphere Zielzellen (B-Lymphozyten, Hepatozyten, Fibroblasten) proinflammatorisch und ist mitverantwortlich für die klinischen Symptome eines SIRS. Von allen „Sepsismediatoren“ ist der IL-6 Spiegel bisher einer der besten Parameter, der sich zur Einschätzung des Schweregrades und des Outcomes bei der Sepsis heranziehen lässt. (HARBARTH S, 2001; OBERHOLZER A, 2005). Neben den proinflammatorischen Eigenschaften wird IL-6 auch eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben. So zeigten die Ergebnisse einiger Studien, dass IL-6 die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie

TNF- $\alpha$  oder IL-1 reduzieren kann und die Freisetzung von antiinflammatorischen Substanzen wie Glukokortikoiden, IL-1ra und löslichen TNF - Rezeptoren erhöht. (OPAL S M, 2000).

### **2.4.3 Interleukin 10**

Das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 inhibiert die Synthese proinflammatorischer Zytokine durch mononukleäre Zellen. Des Weiteren induziert es die systemische Freisetzung von löslichen TNF – Rezeptoren und IL-1 – Rezeptorantagonisten und trägt somit zu einer raschen Inaktivierung und Reduzierung der Wirkung dieser Zytokine bei (SEITZ, M. 1995).

IL-10 ist ein Homodimer, das sich aus zwei Proteinen mit jeweils 18kD Molekulargewicht zusammensetzt. Hauptquelle sind CD4 positive T-Helferzellen, jedoch sind auch B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen in der Lage, IL-10 zu produzieren.

Sowohl bakterielle Endotoxine wie LPS und Viren, als auch Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 können die Produktion von IL-10 induzieren und tragen damit im Sinne eines negativen Feedbacks direkt zum Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischer Entzündungsantwort bei. (VAN DER POLL T, 1994; INOUE G, 2000)

## **2.5 Genetische Polymorphismen bei Sepsis und SIRS**

In den letzten Jahren haben die Fortschritte der Molekularbiologie und v.a. das in den 90er Jahren begonnene „Human genome project“ zur Entschlüsselung tausender Gene und ihrer Variationen beigetragen. Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich seither mit Krankheitsbildern und deren klinischem Verlauf, insbesondere im Hinblick auf den Genotyp der einzelnen Patienten. In so genannten „Gen-Assoziations-Studien“ wurde der Einfluss genetischer Variabilität auf die Pathogenese, den Verlauf und den Behandlungserfolg verschiedener Krankheiten untersucht.

Ein „Gen“ kann man definieren als vererbbarer, codierende Einheit einer spezifischen DNA-Sequenz, die eine bestimmte Position auf einem Chromosom einnimmt. Der Begriff „Allel“ beschreibt zwei oder mehr alternative Formen eines Gens, die den gleichen Locus auf einem Chromosom einnehmen. Unterschiedliche Allele eines Gens können durch verschiedene Arten der Mutation zustande kommen, z.B. durch Insertion, Deletion, Translokation oder Inversion einer einzelnen Base oder eines längeren DNA-Segments.

Der häufigste Typ der genetischen Variation stellt die sog. Einzelbasensubstitution (engl: single nucleotide polymorphism, kurz: SNP) dar. Hierbei handelt es sich um eine stabile Punktmutation, d.h. es lassen sich bei einem repräsentativen Anteil der Bevölkerung (>1%) zwei alternative Basen an einer spezifischen Stelle des DNA-Strangs nachweisen.

Viele dieser Mutationen sind „still“, jedoch können Veränderungen des Genotyps den Phänotyp maßgeblich verändern und sowohl die Pathogenese als auch den Verlauf von Krankheiten beeinflussen.

In einer Vielzahl von Studien wurde der Einfluss verschiedener SNPs auf unterschiedliche Krankheitsbilder untersucht und, obwohl die Studienlage derzeit noch kontrovers ist, lassen einzelne Ergebnisse doch den Schluss zu, dass bestimmte genetische Konstellationen das Risiko für postoperative Komplikationen erhöhen oder einen Einfluss auf die Überlebensrate septischer Krankheitsbilder haben können, z.B. durch die Beeinflussung der pro- und antinflammatorischen Zytokinbalance.

Ein Beispiel ist der Austausch von Guanin anstelle von Cytosin an Position -174 in der Promotorregion des IL-6 Gens. Der Genotyp -174G/G ist bei Patienten nach Operationen und EKZ mit einem Anstieg der IL-6 Konzentrationen im Blutplasma und einer verlängerten Liegezeit auf der Intensivstation assoziiert. (BURZOTTA F, 2001; GAUDINO M, 2003).

Eine Basensubstitution (Guanin statt Adenin) an Position -308 in der Promotorregion des TNF- $\alpha$  Gens, die das sog. TNF2 Allel definiert, ist in einigen Studien mit einer erhöhten TNF- $\alpha$  Ausschüttung sowohl in vivo als auch in vitro assoziiert (LOUIS E, 1998; KROEGER K, 1997). Darüber hinaus zeigen einzelne Untersuchungen, dass der beschriebene Polymorphismus einen Einfluss auf Verlauf und Outcome von cerebraler Malaria, Leishmaniose sowie auf die ambulant erworbene Pneumonie zu haben scheint. (WUNDERINK R G, 2002; CABRERA M, 1995; McGUIRE, W. 1994).

Ein weiteres Beispiel ist die Einzelbasensubstitution von Guanin durch Adenin in der Promotorregion des IL-10 Gens an Position -1082. Sie scheint mit erniedrigten Serumkonzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 assoziiert zu sein, wobei der IL-10 -1082G/G Genotyp in einer Studie von GALLEY et al (2003) mit erniedrigten IL-10 Serumkonzentrationen nach ACB Operationen vergesellschaftet war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines septischen Schocks nach Pneumokokkeninfektion assoziiert ist (SCHAAF B M, 2003).

### **2.5.1 Der TNF- $\beta$ NcoI Polymorphismus**

Anfang der 90er Jahre wurde ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) im ersten Intron des TNF- $\beta$  Gens beschrieben. Aufgrund unterschiedlicher Definitionen wird der entsprechende Polymorphismus in der Literatur auch als Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA)+252 (selten auch als LTA+250 oder LTA+249) Polymorphismus bezeichnet. Am häufigsten ist dabei das

sogenannte TNF-B2 Allel, mit der Base Adenin an Position +252 (LTA+252\*A). Beim deutlich selteneren TNF-B1 Allel befindet sich an dieser Position Guanin (LTA+252\*G).

Dabei ist beim TNF-B1 Allel mit der Basenfolge 5'-CCATGG-3' eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NcoI vorhanden. Dies führt nach NcoI Verdau eines 11kb langen DNA-Abschnitts zu zwei Fragmenten mit einer Länge von 5,7 und 5,3kB. Beim TNF-B2 Allel fehlt durch die Substitution von Guanin anstelle von Adenin die Erkennungssequenz für NcoI: es resultiert ein 11kB langes Fragment trotz NcoI Verdau des DNA Abschnitts. (TABRIZI A R, 2001).

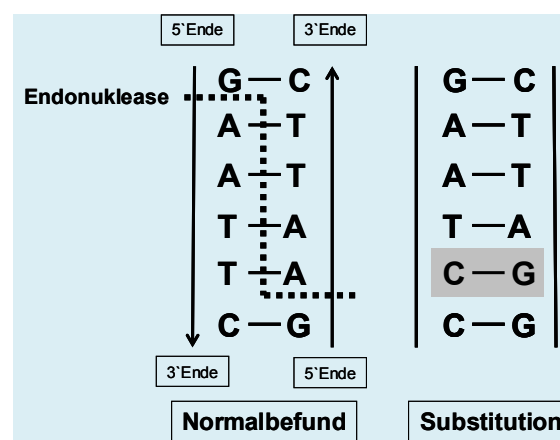


Abb. 2.4: Prinzip des RFLP

Gleichzeitig korreliert diese Variante im Genotyp mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz des TNF- $\beta$  Proteins an Position 26. Bei Trägern des TNF-B1 Allels steht an dieser Stelle Asparagin, während Threonin bei TNF-B2 Allelträgern nachweisbar ist. (WEBB G C, 1990; MESSER G, 1991). Im Hinblick auf die Auswirkungen dieses genetischen Polymorphismus auf Entzündungsreaktionen zeigte sich, dass mononukleäre Zellen von TNF-B1 homozygoten Probanden in vitro eine signifikant erhöhte TNF- $\beta$  Ausschüttung nach Phytohämagglutinin Stimulation aufweisen (MESSER G, 1991).

STUEBER et al fanden 1996 in einer klinischen Studie erhöhte TNF- $\alpha$  Serumkonzentrationen bei TNF-B2 homozygoten Sepsispatienten und beschrieben das Allel TNF-B2 in der gleichen Untersuchung als unabhängigen Risikofaktor für einen letalen Ausgang des septischen Schocks. Weiter wurden bei TNF-B2 homozygoten Patienten während einer posttraumatischen Sepsis höhere TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Vergleich zu TNF-B1 Homozygoten und den Heterozygoten gemessen (MAJETSCHAK M, 1999).

Nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Verwendung der HLM zeigten TNF-B2 homozygote Patienten signifikant höhere TNF- $\alpha$  Serumkonzentrationen verglichen mit TNF-B1 Allelträgern (TOMASDOTTIR H, 2003).

Interessanterweise scheint es zwischen dem TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus und dem TNF- $\alpha$  -308 G/A Polymorphismus ein Kopplungsungleichgewicht zu geben. Dies bedeutet, dass der Genotyp TNF-B2/B2 überzufällig häufig zusammen mit dem Genotyp TNF- $\alpha$  GG auftritt. (HEESEN M, 2003).

## **2.6 Fragestellung**

Die Pathophysiologie postoperativer Entzündungsreaktionen wie SIRS und die damit verbundenen Risiken für den einzelnen Patienten ist schon seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Dabei steht in der vorliegenden Arbeit vor allem die Expressierung einzelner Zytokine im Vollblutansatz im Mittelpunkt des Interesses.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus auf die perioperative Zytokinantwort bei koronarchirurgischen Eingriffen unter Verwendung der EKZ zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf die durch LPS stimulierbare Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 in vitro.

### **3. MATERIAL UND METHODIK**

#### **3.1 Patienten**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Patienten durchgeführt, die sich in der Klinik für Thorax- und Herzgefäßchirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation unterzogen. Nach Prüfung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes bestanden keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens. Es handelt sich um eine prospektive monozentrische Studie. Eine Randomisierung wurde nicht durchgeführt. Die Patienten wurden in chronologischer Reihenfolge in die Studie aufgenommen, sofern keine Ausschlusskriterien (siehe unten) vorlagen. Alle Patienten wurden zusätzlich zur üblichen Prämedikationsvisite ausführlich über das experimentelle Vorgehen sowie über die Ziele der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr mündliches und schriftliches Einverständnis.

##### **3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Teilnehmer der Studie waren ausschließlich erwachsene Patienten beiderlei Geschlechts, bei denen eine elektive aortokoronare Bypassoperation mit extrakorporaler Zirkulation durchgeführt wurde. Bei allen Patienten war vor der Operation eine koronare Mehrgefäßerkrankung koronarangiographisch gesichert worden. Folgende Kriterien oder Begleiterkrankungen führten zum **Ausschluss** von der Untersuchung:

- fehlende Geschäftsfähigkeit
- fehlende Einverständniserklärung des Patienten
- Kombinationseingriff (z.B. gleichzeitiger Eingriff an einer Herzklappe)
- Frühere Operationen am Herzen
- Notfalleingriff
- Ejektionsfraktion < 40 %
- Myokardinfarkt vor weniger als 3 Monaten
- Präoperative Anämie (Hämoglobinwert <12 g/dl)
- Vorbestehende Nierenfunktionsstörung (Kreatinin >1,5 mg/dl)
- Akute oder chronische Entzündung
- Immunologische Erkrankungen
- Exogene Hormonzufuhr
- Bekannte Tumorerkrankung / laufende Chemotherapie



- Adipositas (Body Mass Index  $>30 \text{ kg/m}^2$ )
- Therapie mit Theophyllinderivaten, Steroiden oder nichtsteroidealen Antiphlogistika (NSAID) – außer Acetylsalicylsäure und Clopidogrel
- Teilnahme an einer anderen wissenschaftlichen Untersuchung

Alle Patienten standen unter einer für Koronarpatienten üblichen Dauermedikation mit  $\beta$  – Rezeptor – Antagonisten, Nitraten, ACE – Hemmern oder Calciumantagonisten.

## **3.2 Anästhesie**

### **3.2.1 Prämedikation und Narkoseeinleitung**

Alle Patienten wurden am Vorabend der Operation mit 5mg Nitrazepam (Mogadan®; Hoffmann – La Roche AG, Grenzach-Whylen) und am Operationsmorgen mit 1mg Flunitrazepam (Rohypnol®; Hoffmann – La Roche AG, Grenzach-Whylen) oral prämediziert. Außerdem erhielten alle Patienten am Operationstag ihre vorbestehende Dauermedikation, sofern dies den gängigen Empfehlungen entsprach.

Im Narkoseeinleitungsraum wurde ein 5-Kanal EKG angeschlossen und die Ableitungen II und V5 kontinuierlich registriert. Nach Anlage einer großlumigen intravenösen Venenverweilkanüle in eine Vene am Handrücken oder Unterarm wurde bei den Patienten eine 20 Gauge Teflonkanüle in die Arteria radialis gelegt, die zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdruckes und der Abnahme von arteriellem Blut diente. Danach folgte die intravenöse Narkoseeinleitung. Hierzu wurden Sufentanil (Sufenta®; Jansen Cilag, Antwerpen, Belgien) und Etomidate (Etomidat-Lipuro®; Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Nach Muskelrelaxation mit 0,1mg/kg Pancuronium (Pancuronium Organon®; Organon Teknika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim) erfolgte die orotracheale Intubation. Nach Narkoseeinleitung wurde über die rechte oder linke Vena jugularis interna ein dreilumiger zentraler Venenkatheter eingeführt. Ferner wurden alle Patienten mit einer nasal eingeführten doppelläufigen Magensonde und einem Blasenkatheter versorgt.

### **3.2.2 Narkoseführung**

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch inhalative Zufuhr von Desfluran (Suprane®; Baxter GmbH, Unterschleißheim) und Sufentanil über eine Spritzenpumpe (Injektomat C-PS; Fresenius AG, Bad Homburg).

Ab dem Zeitpunkt der extrakorporalen Zirkulation wurde die Narkose ausschließlich intravenös mit Propofol (Propofol Lipuro®; Braun Melsungen AG, Melsungen) und Sufentanil aufrechterhalten.

Zur Aufrechterhaltung der neuromuskulären Blockade wurde in regelmäßigen Zeitabständen Pancuronium, TOF - Watch gesteuert, nachinjiziert.

Die Verwendung vasoaktiver Substanzen erfolgte nach dem allgemeinen klinischen Vorgehen. Zur Kreislaufunterstützung konnte Noradrenalin (Arterenol®; Aventis, Frankfurt a.M.) mit einer Höchstdosis von bis zu 0,2 µg/kg/min per Dauerinfusion verabreicht werden.

Nach der Operation wurden alle Patienten, intubiert und beatmet, zur weiteren Betreuung auf die Intensivstation der Abteilung für Thorax- und Herzgefäßchirurgie verlegt.

### **3.2.3 Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution**

Im Rahmen der Narkoseeinleitung wurde den Patienten durchschnittlich 1000 ml einer isotonen Vollelektrolytlösung (Sterofundin®; Braun Melsungen AG, Melsungen) infundiert. Zusätzlich wurden 1,5 g Cefuroxim (Zinacef®; Höchst Pharma, Frankfurt/Main) intravenös verabreicht. Die weitere Infusionstherapie zur Entwöhnung von der EKZ war nicht standardisiert. Nach klinischen Kriterien wurden Vollelektrolyt- oder Gelatinelösungen (Gelafundin®; Braun Melsungen AG, Melsungen) sowie Blutpräparate, orientiert an physiologischen Transfusionstriggern verabreicht. Das aus dem Operationsgebiet und nach Ende der EKZ aus der Maschine abgesaugte Blut wurde maschinell aufbereitet (Cell-saver®; Haemonetics, München) und das dadurch wieder gewonnene autologe Erythrozytenkonzentrat bis zum Operationsende retransfundiert. Die weitere Infusionstherapie auf der Intensivstation der Klinik für Thorax- und Herzgefäßchirurgie war durch das Studienprotokoll unbeeinflusst und folgte abteilungsspezifischen Richtlinien.

## **3.3 Herz-Lungen-Maschine**

### **3.3.1 Füllung der Herz-Lungenmaschine**

Das Füllvolumen der Herz-Lungen-Maschine bestand bei allen Patienten aus 1500 ml Ringer-Lactat - Lösung (Ringer-Lactat DAB 7 Braun®; Braun Melsungen AG, Melsungen) und 500 ml Gelatinelösung.

### 3.3.2 Extrakorporale Zirkulation

Nach Eröffnung des Perikards erhielten alle Patienten zur vollständigen Aufhebung der Blutgerinnung vor Kanülierung der Aorta einen Bolus von 400 IE/kg KG Heparin (Heparin Natrium Braun®, Braun Melsungen AG, Melsungen) über den zentralen Venenkatheter. Die Überwachung der Heparinwirkung erfolgte dann durch wiederholte Bestimmung der „Activated Coagulation Time“ (ACT) (Hemochron®; Incorporation, Edison, NY, USA) im Vollblut. Bei Bedarf erfolgten weitere Bolusinjektionen von 5000 – 10 000 I.E. Heparin. Für die extrakorporale Zirkulation wurden eine Rollerpumpe (Stöckert Instrumente GmbH, München) und ein Membranoxygenator (Medtronic Maxima®; Medtronic, Düsseldorf) verwendet. Um Blutkoagel und Gewebepartikel abzufangen, war im arteriellen und venösen Schenkel der Herz-Lungen-Maschine jeweils ein 40 µm Filter integriert. Das Schlauchsystem (FA Jostra, Hirrlingen) der Herz-Lungen-Maschine war unbeschichtet. Die Einleitung des arterialisierten Blutes erfolgte über die Aorta ascendens, die venöse Drainage durch eine über das rechte Herzohr eingeführte Zweistufenkanüle. Die Regulation des Säure-Basen-Status erfolgte nach dem pH-Stat Prinzip.

Die extrakorporale Zirkulation wurde mit nicht pulsatilem Blutfluss und einem Strom-Zeit-Volumen von 2,4 l/min/m<sup>2</sup> Körperoberfläche betrieben. Als Perfusionsdruck wurde ein arterieller Mitteldruck zwischen 50 und 90 mmHg angestrebt und gegebenenfalls durch Zugabe vasoaktiver Substanzen auf diesen Bereich eingestellt. Ein während der EKZ auftretender Volumenmangel konnte nach klinischen Gesichtspunkten (Aufrechterhaltung des Blutflusses, Hämatokritwert, Urinausscheidung) durch zusätzliches Nachfüllen von Gelatine-Lösung in die Herz-Lungen-Maschine ausgeglichen werden. Als unterer Grenzwert der Hämodilution wurde während der Dauer des kardiopulmonalen Bypass ein Hkt von 20 % angesehen, bei dessen Unterschreiten nach dem Studienprotokoll die Transfusion von autologen Erythrozytenkonzentraten erfolgte. Nach Ende der extrakorporalen Zirkulation wurde zur Wiederherstellung der Blutgerinnung, in Abhängigkeit von der zuvor applizierten Heparinmenge, Protamin (Protamin Roche®, Hoffmann – La Roche AG, Grenzach-Wyhlen), verdünnt in 100 ml isotoner Kochsalzlösung in nicht weniger als 15 min infundiert. Ein Kontroll-ACT-Wert nach Protamingabe im Bereich des Ausgangswertes (vor Heparingabe)  $\pm 20\%$  galt als ausreichend für die Wiederherstellung der Blutgerinnung. Zur Optimierung der Füllungsdrücke und Unterstützung der Myokardkontraktilität erhielten die Patienten im Bedarfsfall während und nach Entwöhnung von der extrakorporalen Zirkulation Noradrenalin bzw. Nitroglycerin per infusionem.

### 3.3.3 Organprotektion

Zur Senkung des Sauerstoffverbrauchs während der extrakorporalen Zirkulation wurde die aortokoronare Revaskularisation in mäßiger Hypothermie des Patienten durchgeführt, wobei die Kühlung intern über einen im Oxygenator der Herz-Lungen-Maschine integrierten

Wärmeaustauscher (Medtronic, Düsseldorf) erfolgte. Zur weiteren Myokardprotektion wurde unmittelbar nach Aortenabklemmung und bei möglichst entlastetem linken Herzen antegrad gekühlte kardioplegische Lösung (Blutkardioplegie nach Buckberg; Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, Germany) in die Aortenwurzel infundiert. Die dazu verwendete Kanüle diente dann im weiteren Verlauf der Operation auch als Aortic-Root-Vent zur Drainage des linken Ventrikels.

### **3.4 Studienaufbau**

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in der Promotoregion des TNF- $\beta$  Gens auf die endotoxinstimulierte Zytokinantwort nach extrakorporaler Zirkulation untersucht werden. Stellvertretend für die proinflammatorische Zytokinantwort wurden TNF- $\alpha$  und IL-6 gemessen, sowie IL-10 als Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine. Um sowohl die präoperative Endotoxinsensibilität als auch die postoperative Endotoxintoleranz darstellen zu können, wurde Endotoxin gramnegativer E. coli Bakterien (Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4) als Stimulans verwendet.

Den Patienten wurde präoperativ (T1), intraoperativ 20min nach Beendigung der EKZ (T2) und 24h postoperativ (T3) Blutproben entnommen und entsprechend dem Studienprotokoll weiterverarbeitet (s. Abb).

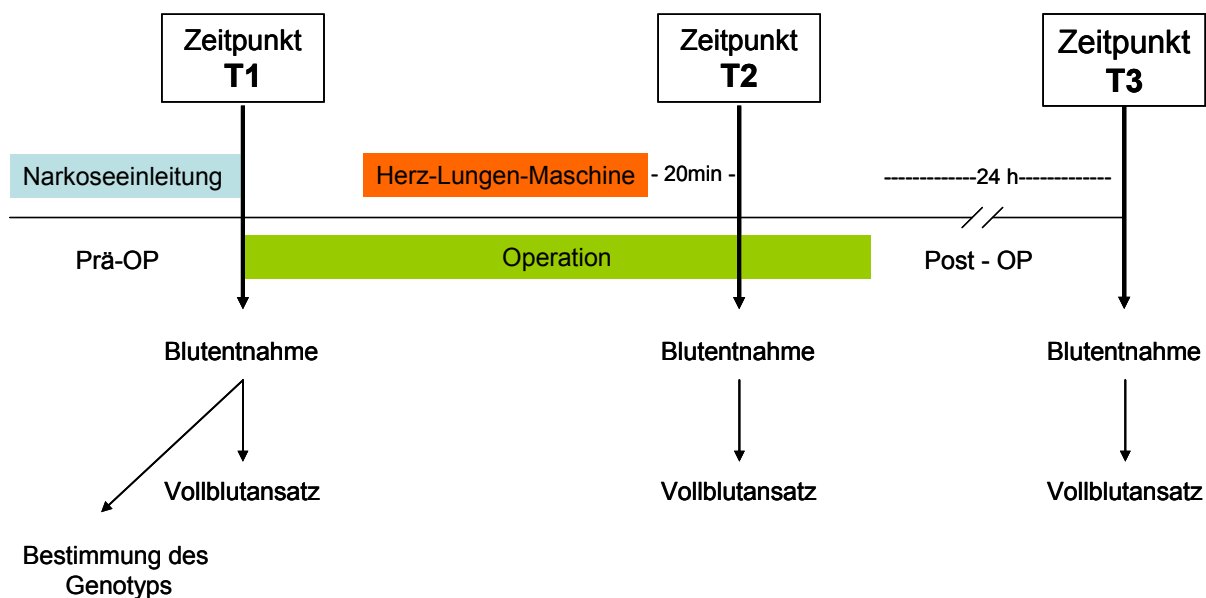


Abb. 3.1: Studienaufbau

### **3.5 Labormaterialien**

Die verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und waren von der höchsten erhältlichen Reinheit. Andere Hersteller werden im Folgenden entsprechend gesondert erwähnt.

### **3.6 Vollblutansatz**

Von den Studienpatienten wurde zu den oben genannten Zeitpunkten arterielles Blut mit Lithium-Heparinmonovetten (Sarstedt Monovette®, Nuembrecht) entnommen und die Blutproben auf Eis sofort ins Forschungslabor der Anästhesie transportiert. In Anlehnung an das von WILSON et. al. (1991) beschriebene Vollblutprotokoll wurden die Blutproben dann sofort steril weiterverarbeitet: Das Blut wurde 1:5 mit Zellkulturmedium RPMI (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) verdünnt und direkt in vier Proben à 2,5 ml auf eine 24-well TC Platte (Cellstar®; Greiner bio-one, Kremsmünster) aufgeteilt. Dann wurden die Proben bei 37 °C in einer Raumluf-Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> Zusatz und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und nach 1 h wie folgt weiterbehandelt:

***Probe 1 und 2:*** Zugabe von 1µg/ml LPS (Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4)

***Probe 3 und 4:*** Kontrollproben – hier erfolgte keine Stimulation

Anschließend wurden die Proben für weitere 24 h inkubiert und danach die Überstände zur Messung der Zytokinkonzentrationen abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C eingefroren.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die von uns gewählte Dosierung von 1 µg/ml LPS nach einer 24 stündigen Inkubationszeit zu einer maximalen Stimulation der monozytären Zytokinantwort führt. Dies bestätigt sich auch in einer Vielzahl weiterer Publikationen (ERTEL W, 1995 ; KREUZ M, 1997; MITOV I G, 1997).

### **3.7 Zytokinbestimmung**

Die Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 vor und nach Endotoxinstimulation wurden mittels Enzyme linked immunabsorbent assay (ELISA) gemessen. Bei den verwendeten Zytokinassays handelte es sich um kommerziell erhältliche ELISA-Sets (BD Biosciences; San Diego, USA) die alle nach dem „Sandwichprinzip“ arbeiten. Hierbei wird das zu bestimmende Zytokin zwischen zwei Antikörpern eingebettet. Die Messung wurde gemäß der vom Hersteller der ELISA-Sets angegebenen Analysetechnik durchgeführt.

**Puffer und Lösungen für alle Messungen (BD OptEIA™ Reagent Set B (Cat. Nr. 550534 )**

Coating-Puffer	0,2 M Natriumphosphat-Lösung, pH 9,0, 5,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 8,05 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 250 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH mit 1 M NaOH auf 9,0 einstellen, Volumen auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O; Bei 4 ° C 30 Tage haltbar
Assay-Diluent	PBS mit 10% FCS, pH 7,0 Je Platte: 4 ml FCS und 36 ml PBS
Wasch-Puffer	PBS, 0,05 % Tween-20 Je Platte: 550 ml PBS und 275 µl Tween-20
Substratlösung	Zusammengesetzt aus: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (=Substratreagenz B) und Pufferlösung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (=Substratreagenz A)
Stopplösung	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

10x PBS-Stocklösung	80,0g NaCl + 11,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2,0g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2,0g KCL in 500ml H <sub>2</sub> O, pH ad 7,0, Volumen auf 1l mit H <sub>2</sub> O
---------------------	--

**Human IL-6 ELISA Set (BD Biosciences Cat. No. 555220)**

- **Capture antibody:** Monoklonaler Anti -“humanes IL-6” Antikörper
- **Detection Antibody:** Monoklonaler Anti-“humanes IL-6” Antikörper, biotinyliert.
- **Enzyme Reagent:** Avidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat
- **Standards:** Rekombinantes humanes IL-6, lyophilisiert

*Standardverdünnungsreihe:*

300 pg/ml – 150 pg/ml – 75 pg/ml – 37,5 pg/ml – 18,8 pg/ml – 9,4 pg/ml – 4,7 pg/ml

**Human IL-10 ELISA Set (BD Biosciences Cat. No. 555157)**

- **Capture antibody:** Monoklonaler Anti-“humanes IL-10” Antikörper
- **Detection Antibody:** Monoklonaler Anti-“humanes IL-10” Antikörper, biotinyliert
- **Enzyme Reagent:** Avidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat
- **Standards:** Rekombinantes humanes IL-10, lyophilisiert

*Standardverdünnungsreihe:*

500 pg/ml – 250 pg/ml – 125 pg/ml – 62,5 pg/ml – 31,2 pg/ml – 15,6 pg/ml – 7,8 pg/ml

**Human TNFα ELISA Set (BD Biosciences Cat. No. 555212 )**

- **Capture antibody:** Monoklonaler Anti-“humanes TNF-α“ Antikörper
- **Detection Antibody:** Monoklonaler Anti-“humans TNF-α“ Antikörper, biotinyliert
- **Enzyme Reagent:** Avidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat
- **Standards:** Rekombinantes humanes TNF-α, lyophilisiert

*Standardverdünnungsreihe:*

500pg/ml – 250pg/ml – 125pg/ml – 62,5 pg/ml – 31,2 pg/ml – 15,6 pg/ml – 7,8 pg/ml

Für alle zu bestimmenden Zytokine ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate 96-well, Nunc GmbH, Wiesbaden) mit 100 µl/well Coating-Puffer, der 2µl/ml capture antibody enthielt. Anschließend wurde die Platte bei 4 °C inkubiert.

Nach 12 stündiger Inkubationszeit wurde die Platte sechs Mal gewaschen und durch Zugabe von 200 µl/well Assay-Diluent wurden die noch unbesetzten freien Bindungsstellen des Kunststoffes 1h bei Raumtemperatur abgesättigt.

Nach erneutem sechsmaligem Waschen erfolgte dann das Auftragen der Standardverdünnungsreihen und der zu analysierenden Proben (je 100 µl/well) mit einer anschließenden Inkubation bei 27 °C über zwei Stunden wobei der gebundene Antikörper eine Verbindung mit dem zu messenden Zytokin einging.

Durch erneutes Waschen wurden anschließend alle ungebundenen Proteine entfernt und 100 µl/well Sekundärantikörper (Detection antibody + Enzyme-Reagent) aufgetragen. Die Platte wurde danach erneut eine Stunde lang bei 27 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Substratlösung zum Starten der Farbreaktion.

Dieser Reaktionsschritt wurde nach ausreichender Farbreaktion (ca. 15-30 min) mit 50 µl/well Stopplösung beendet.

Es folgte die photometrische Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm), wobei die Farbreaktion proportional zur Zytokinkonzentration war.

Bei jeder Messung wurde eine Standardkurve berechnet, anhand derer dann die exakten Zytokinkonzentrationen bestimmt werden konnten.

Die Absorption wurde für alle Assays mit einem ELISA-Reader (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) gemessen, die Daten mit dem dazu passenden „MikroWin“-Softwarepaket (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) ausgewertet und die exakten Standardkurven und Zytokinkonzentrationen ermittelt.

Die Messungen erfolgten innerhalb von zwei Monaten nach den Blutentnahmen. Alle Proben waren bis zur Messung bei -70 °C eingefroren. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass LPS die Zytokinausschüttung um ein Vielfaches steigert, wurden die Proben für die Bestimmung von TNF-α 1:10 und für die Messung von IL-6 1:1000 verdünnt. Dadurch konnte eine Messung im linearen Bereich der Standardkurve gewährleistet werden. Die Proben für IL-10 blieben unverdünnt.

### **3.8 Bestimmung des Genotyps mittels PCR und Gelelektrophorese**

Der Genotyp des NcoI RFLP im TNF- $\beta$  Gen wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und einem enzymatischen Verdau des PCR Produkts mit NcoI bestimmt.

#### **3.8.1 Aufarbeitung der DNA**

Zur Gewinnung von DNA und anschließender Genotypisierung wurden jedem Patienten zum ersten Entnahmezeitpunkt (T1) mit einer EDTA – Monovette (Sarstedt Monovette®, Nuembrecht) ca. 2ml Blut entnommen, sofort auf Eis ins Forschungslabor der Anästhesie gebracht und dort bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren.

Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Quiagen, Hilden), wobei exakt nach den Vorgaben des Herstellers verfahren wurde. Kurz gefasst ergaben sich hier folgende Arbeitsschritte:

- 1.) **Lyse:** Mit Hilfe der Proteinase K wurden zunächst die Zellen der Blutprobe lysiert. Hierzu wurden 20 $\mu$ l Proteinase K, 200  $\mu$ l EDTA-Blut und 200  $\mu$ l des Lyse – Puffers (Buffer AL) in strenger Reihenfolge in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 15 Sekunden mit einem Puls-Vortexer (Vortex Genie2; Scientific Industries Inc., New York, USA) gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 56 °C wurde der Probe 200  $\mu$ l Ethanol 96% zugesetzt.
- 2.) **Bindung der freien DNA an der QIAamp Membran:** Das Gemisch wurde anschließend durch eine Siliciumgel-beschichtete Membran in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen (QIAamp Spin column®) bei 8000 U/min 1 min lang abzentrifugiert, wobei die Pufferzusammensetzung des ersten Schritts eine optimale Anlagerung der DNA an die Membran gewährleistete, während Proteine und andere Verunreinigungen nicht an der Membran zurückgehalten wurden.
- 3.) **Entfernung von Verunreinigungen:** Um noch letzte Verunreinigungen der gebundenen DNA zu entfernen folgten nun zwei weitere Waschschrte. Im ersten Schritt wurde das Zentrifugenröhrchen mit 500  $\mu$ l AW1 Buffer befüllt, bei 8000 U/min eine Minute lang zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es folgte der zweite Schritt mit 500  $\mu$ l AW2 Buffer wobei nun für drei Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert wurde.
- 4.) **Ablösen der gereinigten DNA von der Membran:** Durch Zugabe von 200  $\mu$ l destilliertem Wasser und einer kurzen Inkubation bei Raumtemperatur wurde schließlich die DNA von der Membran abgelöst und durch einminütiges Zentrifugieren bei 8000U/min in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen.



- 5.) **Bestimmung des Reinheitsgrades der gewonnenen DNA:** Zur Messung von Menge und Reinheit der gewonnenen DNA wurden 20 µl des Endproduktes mit 80 µl destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption gegen eine Leerprobe (Aqua ad injectabile®, Fa. Braun, Melsungen) im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$  gemessen. Aus der so gemessenen Optischen Dichte (OD) wurde die Menge der enthaltenen DNA berechnet.

$$\text{DNA-Menge } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } (= 5)$$

Des Weiteren wurde die Reinheit mit Hilfe des Verhältnisses der Absorption (A) bei 260nm zur Absorption bei 280nm bestimmt, wobei eine Ratio von  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,7 und 1,9 gemäß der Herstellerangaben als rein und frei von Protein und anderen Verunreinigungen angesehen wurde.

### 3.8.2 Amplifizierung der DNA mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) können definierte DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt werden.

Im vorliegenden Fall wurde ein 782bp langes DNA Fragment der Promotorregion des TNF- $\beta$  Gens vervielfältigt. Dieses Fragment beinhaltet das erste Intron dieses Gens und somit den beschriebenen NcoI RFLP.

Zur Durchführung der PCR wurden 50µl Reaktionsansatz gekühlt und unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Dieser Reaktionsansatz beinhaltete: 1,25 U einer Thermus aquaticus YT1 thermostabilen Polymerase (Axor Labortechnik, Kaiserslautern), jeweils 20 pmol von Primer A (5'CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA3') und Primer B (5'AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC 3') (Operon Biotechnologies GmbH, Köln),  $\text{NH}_4$  – Reaktionspuffer, 1,75 mM MgCl sowie 200 µmol Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Hinzu kamen noch 10 – 20 ng der Patienten DNA und steriles Wasser, so dass sich ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz ergab. Die Proben wurden danach vorsichtig mit einem Puls-Vortexer gemischt und anschließend kurz zentrifugiert um zu gewährleisten, dass sich das gesamte Reaktionsgemisch am Boden des PCR-Gefäßes befand.

Die Vervielfältigung des 782 bp Fragments erfolgte mit einem automatischen PCR-Cycler (Gene-Amp PCR System 2400®; Perkin Elmer, Darmstadt). Dabei wurde folgendes Protokoll eingehalten:

Zunächst wurden in einer Phase von 5 Minuten bei 95 °C alle DNA Stränge denaturiert. Danach folgten 39 Zyklen nach dem Schema:

- 1.) Denaturierung (30 sec. bei 95 °C)
- 2.) Anlagerung der Primer (30 sec. bei 50 °C)
- 3.) Anlagerung und „schreiben“ der DNA (45 sec. bei 72 °C).

Nach Beendigung aller Zyklen, folgte eine 6 minütige Phase bei 72 °C zur Vervollständigung der DNA Stränge.

*Das PCR Protokoll im Überblick:*

<b>Reaktionsansatz:</b>	
Steriles Wasser:	37,7 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
MgCl 50 mM	1,75 µl
dNTP-Mix 12,5 mM	0,8 µl
Primer sense 20 pmol	2 µl
Primer antisense 20 pmol	2 µl
Taq Polymerase 5 U/µl	0,25 µl
DNA	0,5 µl
<i>Gesamt:</i>	<i>50 µl</i>

Cyclerprogramm:		
95 °C	5 min	
95 °C	30 sec	39 Zyklen
59 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	6 min	

Zur Kontrolle wurden direkt im Anschluss an den Amplifizierungsprozess 9 µl des PCR Produkts zusammen mit 2 µl Puffer auf ein Ethidiumbromid-haltiges, 2 %iges Agarosegel (perGOLD Universalagarose; peqlab, Erlangen) in TAE-Puffer aufgetragen und in einer Elektrophoresekammer (EasyCast™ Electrophoresis System; Owl-scientific, Portsmouth, USA) bei einer angelegten Spannung von 80 V (Consort Bioblock E452, Consort nv, Turnhout, Belgien) und einer Laufzeit von 50 min aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Stränge werden dabei von dem elektrischen Feld in Richtung Kathode durch die Gelmatrix gezogen, wobei kleinere Moleküle schneller wandern als große. Eine gleichzeitig aufgetragene DNA-Leiter mit DNA-Strängen definierter Größe dient als Referenz.

Anschließend erfolgte die Auswertung unter UV-Licht (Rothaar und Schröder Laborgeräte, Heidelberg). Die Proben wurden nur weiterverarbeitet, wenn sich hierbei eine definierte Bande mit einer Größe von 782 bp zeigte.

### 2.8.3 Bestimmung des RFLP mittels NcoI Verdau

Im Anschluss erfolgte die Genotypanalyse mit 17 µl des PCR-Produktes, dem 1 µl NcoI Endonuklease (10 U/µl, MBI Fermetas, St. Leon-Rot) und 2 µl 33 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-acetat, 66 mM Kalium-acetat sowie 0,1 mg/ml BSA (BufferY<sup>+</sup>/Tango™, MBI Fermetas, St. Leon-

Rot) zugesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C konnte von einem vollständigen Verdau aller DNA-Stränge durch NcoI ausgegangen werden (MAJETSCHAK M, 1999).

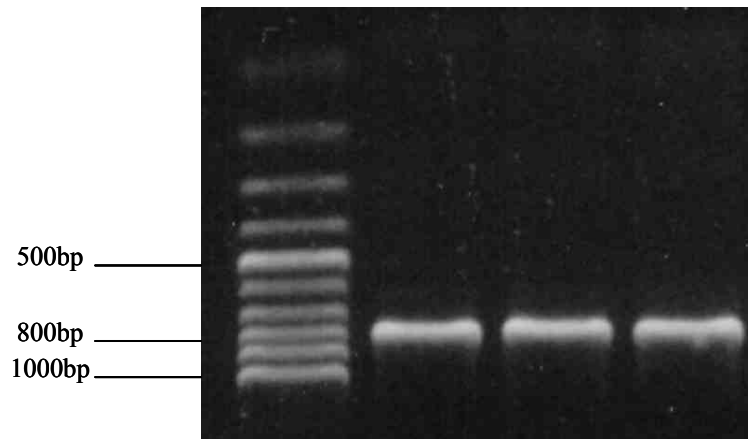


Abb.3.2: Das ungeschnittene PCR Produkt: Links als Referenz die 100 bp DNA-Leiter, rechts drei Proben mit der erwarteten Länge von 782 bp.

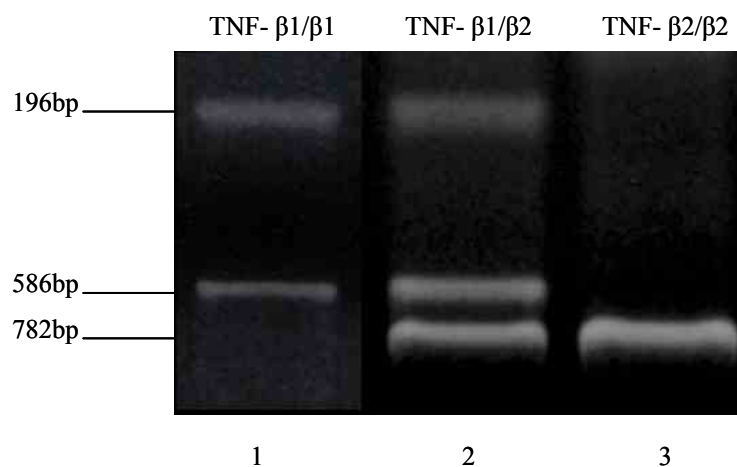


Abb. 3.3: Das PCR-Produkt nach NcoI-Verdau: (1) Genotyp B1B1: Bei beiden Allelen ist die NcoI Schnittstelle vorhanden; die zwei Banden entsprechen den Fragmenten mit 196 bp und 586 bp Länge. (2) Genotyp B1B2: Während das eine Allel noch eine NcoI Schnittstelle aufweist, fehlt sie beim zweiten Allel: Es resultieren drei Banden. (3) Genotyp B2B2: Beiden Allelen fehlt die Schnittstelle: das Bild entspricht dem unverdauten PCR Produkt.

Nach vollständigem Verdau wurden jeweils 17 µl der Proben auf ein 3 % Agarosegel aufgetragen und in der Elektrophoresekammer für 50 min bei 80 V aufgetrennt, die Banden mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und unter UV-Licht zur Auswertung fotografiert.

Beim TNF-B1 Allel, bei dem die Schnittstelle für das Enzym vorhanden ist, wird das ehemals 782 bp lange DNA Fragment durch NcoI in zwei, jeweils 192 bp und 586 bp lange Fragmente zerteilt. Bei dem TNF-B2 Allel ist diese Schnittstelle durch den Austausch einer Base verloren gegangen, sodass in diesem Fall nur das ursprüngliche, 782 bp lange Fragment sichtbar ist (s. Abb. 3.3).

### **3.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des kommerziell erhältlichen Software-Paketes Sigma-Stat® (Version 2.03, SPSS Sciences Software GmbH, Erkrath). Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot 2000® verwendet.

Alle Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM), sofern eine Normalverteilung vorlag. War dies nicht der Fall, sind Median und die 25% und 75% Perzentile angegeben.

Um die Daten der Gruppen zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA oder „ANOVA on ranks“). Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Patientendaten wurde eine Varianzanalyse für wiederholte Messungen durchgeführt (Patientendaten vs. Zeit). Als post-hoc Test bei signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen wurde der Student-Newman-Keuls-Test gewählt. Beim direkten Vergleich zweier Zeitpunkte oder Gruppen wurde ein einfacher t-Test verwendet.

Waren die Kriterien für die Durchführung parametrischer Testverfahren nicht erfüllt, so wurden entsprechende nichtparametrische Analyseverfahren (Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test bzw. Friedman-Test) angewandt. Alle Tests waren zweiseitig. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  definiert.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Demographische Daten und Genotypisierung

#### 4.1.1 Charakteristika der Studiengruppe

Die in die Studie einbezogenen 40 Patienten repräsentierten ein typisches Kollektiv von Patienten zur aortokoronaren Revaskularisation mit den entsprechenden erkrankungsspezifischen Risikofaktoren. Patienten, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung postoperativer Organfunktionsstörungen aufwiesen, wurden gemäß den vorformulierten Ausschlusskriterien nicht in die Studie aufgenommen.

Keiner der Patienten entwickelte im postoperativen Beobachtungszeitraum ein Multiorganversagen oder verstarb während des Krankenhausaufenthaltes.

		<i><b>TNF-B1B1 Homozygote (TNF-B1B1)</b></i>	<i><b>TNF-B1B2 Heterozygote (TNF-B1B2)</b></i>	<i><b>TNF-B2B2 Homozygote (TNF-B2B2)</b></i>	<i><b>p-Wert:</b></i>
<b>N</b>		21		19	
<b>Alter [Jahre]</b>		61,85±1,86		61,13±1,80	0,542
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>		26,02±0,619		26,68±0,56	0,432
<b>Geschlecht m/w</b>		20/1		13/6	0,040
<b>LVEF [%]</b>		62,33±2,13		68,11±2,90	0,110
<b>NYHA – Stadium:</b>	I	9 (42,9 %)		4 (21,1 %)	0,578
	II	9 (42,9 %)		15 (78,9 %)	
	III	2 (9,5 %)		0 (0 %)	
	IV	1 (4,8 %)		0 (0 %)	
<b>CCS – Stadium</b>	0	5 (23,8 %)		6 (31,6 %)	0,297
	1	4 (19,0 %)		3 (15,8 %)	
	2	5 (23,8 %)		6 (31,6 %)	
	3	1 (4,8 %)		3 (15,8 %)	
	4	6 (28,6 %)		1 (5,3 %)	
<b>OP – Dauer [min]</b>		192,14±7,94		188,4±5,1	0,702
<b>Extrakorporale Zirkulation [min]</b>		79,57±3,08		74,5±2,1	0,185
<b>Aortenklemmzeit [min]</b>		57,57±2,27		49,2±2,5	0,016

Tab. 4.1: Demographische Daten der Patienten [Angaben als Mittelwerte±SEM oder Absolutwert (Prozent)]

#### 4.1.2 Genotypverteilung und Allelfrequenz

Durch die Analyse des Genotyps konnten 4 Patienten (10 %) als homozygot für das Allel TNF-B1, 19 Patienten (47,5 %) als homozygot für das Allel TNF-B2 und 17 Patienten (42,5 %) als heterozygot TNF-B1B2 identifiziert werden. Die Frequenz des Allels TNF-B1 betrug damit 0,31, die des Allels TNF-B2 0,69.

#### 4.1.3 Vergleich der demographischen Daten

Entsprechend ihres Genotyps wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Aufgrund der niedrigen Allelfrequenz des TNF-B1 Allels wurden alle Patienten, die homo- oder heterozygot für das Allel TNF-B1 waren in einer Gruppe zusammengefasst. Somit ergaben sich zwei homogene Gruppen, die sich entsprechend der Häufigkeit der Allele in ihrer Größe, nicht jedoch signifikant in Bezug auf Alter, Body-Mass-Index (BMI), linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA- und CCS – Stadium unterschieden. Dem gegenüber befanden sich in der Gruppe der TNF-B1 Allelträger signifikant weniger weibliche Patienten. Die mittlere Aortenklappenzeit war in der Gruppe der TNF-B2 Homozygoten signifikant kürzer.

### 4.2. Zytokinantwort im Gesamtkollektiv

#### 4.2.1 Unstimulierte Zytokinantwort

Die TNF- $\alpha$  Konzentrationen in den unstimulierten Proben lagen zu allen Messzeitpunkten bis auf wenige Ausnahme unter der Nachweisgrenze des verwendeten Assays. Beim Vergleich der Mittelwerte lagen die TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Patientenserum präoperativ bei 1,0 pg/ml ( $\pm 0,7$ ) und stiegen zum Zeitpunkt T2 auf 2,1 pg/ml ( $\pm 1,2$ ) an um zum Zeitpunkt T3 wieder auf Werte von 0,6 pg/ml ( $\pm 0,3$ ) abzufallen (vgl. Tab. 4.2 und Abb. 4.1). Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der drei Zeitpunkte ergab sich nicht ( $p=0,98$ ).

Bezüglich der IL-10 Konzentrationen, zeigte sich in den unstimulierten Proben der Vollblutansätze 20 min nach EKZ (T2) ein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentrationen auf Werte von 12,1 pg/ml ( $\pm 2,9$ ), verglichen mit 3,3 pg/ml ( $\pm 1,5$ ) zum Zeitpunkt T1 nach Narkoseeinleitung ( $p=0,013$  T1vs T2). Nach 24 h (T3) lagen die IL-10 Serumspiegel mit 2,6 pg/ml ( $\pm 1,2$ ) wieder im Bereich des Ausgangsniveaus ( $p=0,004$  T2 vs T3).

Bei den Messwerten von IL-6 im Patientenserum zeigte sich zu T2 ein deutlicher Anstieg der IL-6 Konzentrationen. 2,9 pg/ml ( $\pm 0,4$ ) zum Zeitpunkt T1 vs 9,7 pg/ml ( $\pm 1,0$ ) zum Zeitpunkt T2

( $p < 0,001$ ). 24 h postoperativ waren zehnfach höhere Konzentrationen von IL-6 zu messen als Präoperativ (T1). Im Mittel 31,3 pg/ml ( $\pm 5,5$ ), ( $p < 0,001$  vs T2 und T1).

		T1	T2	T3
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> [pg/ml]	<i>Unstimuliert</i>	1,0 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,3
	<i>LPS-stimuliert</i>	2199,1 $\pm$ 187,5***	428,6 $\pm$ 67,6***	1197,9 $\pm$ 164,2***
<b>IL-10</b> [pg/ml]	<i>Unstimuliert</i>	3,3 $\pm$ 1,5#	12,1 $\pm$ 2,9	2,6 $\pm$ 1,2#
	<i>LPS-stimuliert</i>	286,4 $\pm$ 31,1***	91,884 $\pm$ 10,4***	294,3 $\pm$ 20,4***
<b>IL-6</b> [pg/ml]	<i>Unstimuliert</i>	2,9 $\pm$ 0,4\$	9,7 $\pm$ 1,0	31,3 $\pm$ 5,5\$
	<i>LPS-stimuliert</i>	53391,8 $\pm$ 5235,5***	16413,4 $\pm$ 1946,0***	56539,2 $\pm$ 5154,0***

Tab 4.2: Zytokinkonzentrationen vor und nach LPS Stimulation der Vollblutansätze

(Gesamtkollektiv  $n=40$ ) \*\*\*  $p < 0,001$  unstimulierte vs. LPS - stimulierte Werte; #  $p < 0,05$  vs T2; \$  $p < 0,001$  vs

T2 [Angaben als Mittelwerte $\pm$ SEM]

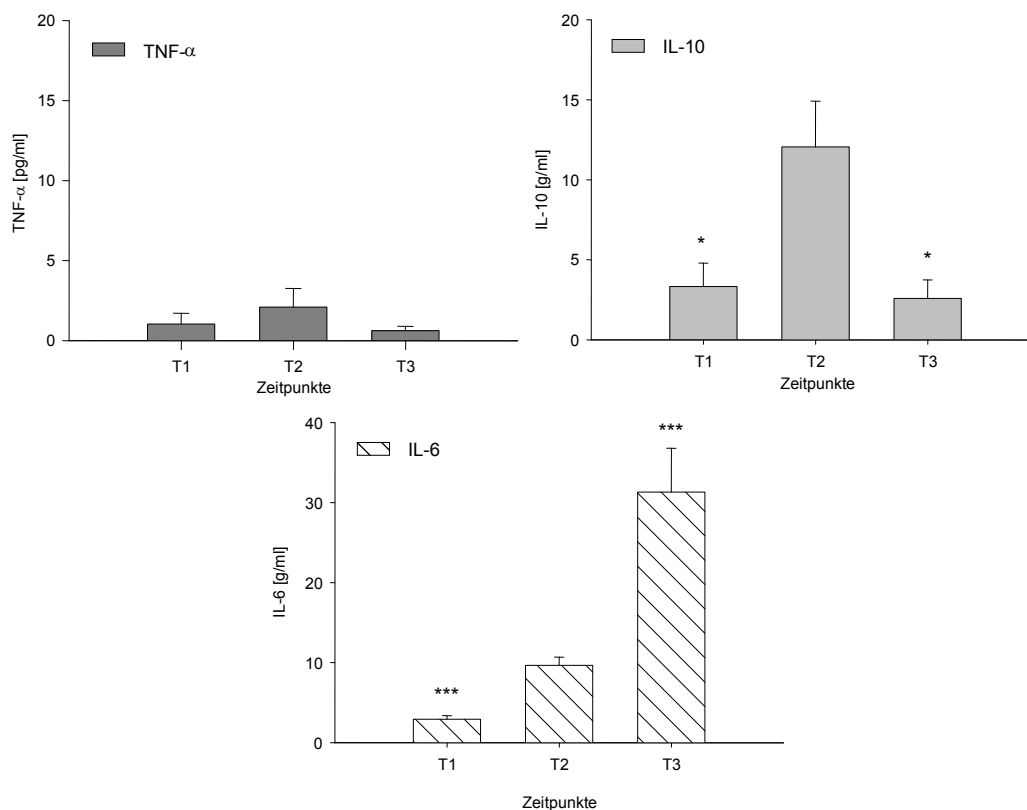


Abb. 4.1: Unstimulierte Zytokinfreisetzung in den Vollblutansätzen (Gesamtkollektiv n=40)

T1: nach Narkoseeinleitung, T2: 20 min nach Ende der EKZ, T3: 24 h postoperativ.

\*  $p < 0,05$  vs. T2; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. T2 [Darstellung: Mittelwert  $\pm$  SEM]

#### 4.2.2 Zytokinantwort nach Endotoxinstimulation

Nach LPS Stimulation der Vollblutansätze kam es bei fast allen Patienten zu allen Zeitpunkten zu einer signifikanten und im Umfang exponentiell gesteigerten Freisetzung aller untersuchten Zytokine (s. Tab. 4.2). Zum Zeitpunkt T2 (20 min nach EKZ) war bei allen untersuchten Zytokinen eine signifikant geringere Ausschüttung im Vergleich zu den Ausgangswerten (T1) zu erkennen. So war die TNF- $\alpha$  Ausschüttung nach Endotoxinstimulation zum Zeitpunkt T2 mit 428,6 pg/ml ( $\pm 67,6$ ) im Mittel um ca. 80% gegenüber dem Ausgangswert von 2199,1 pg/ml ( $\pm 187,5$ ) supprimiert ( $p < 0,001$ ).

Ein vergleichbarer Verlauf zeigte sich auch bei der Messung der IL-10 Konzentrationen nach Endotoxinstimulation. Hier war die Stimulierbarkeit unmittelbar nach der HLM (T2) ca.

60% niedriger als zum Zeitpunkt T1. (286,431,1 zu T1 vs 91,884  $\pm$  10,4 zu T2;  $p < 0,001$ ). Am ersten postoperativen Tag (T3) lagen die gemessenen Werte wieder bei 294,3 pg/ml ( $\pm 20,4$ ) und damit im Bereich des Ausgangswertes (T1).



Ebenfalls 60% geringer als zum Zeitpunkt T1 fiel die Stimulierbarkeit der IL-6 Ausschüttung zum Zeitpunkt T2 im Gesamtkollektiv der Patienten aus ( $53391,8 \pm 5235,5$  vs.  $16413,4 \pm 1946,0$ ;  $p < 0,001$ ).

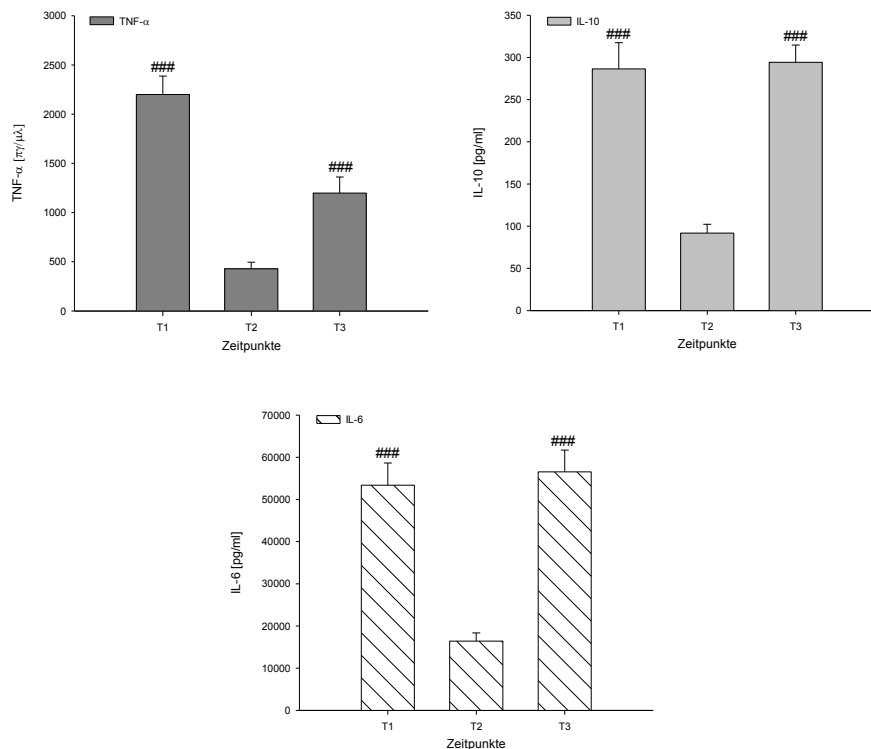


Abb. 4.2: Endotoxinstimulierte Zytokinfreisetzung in den Vollblutansätzen (Gesamtkollektiv  $n=40$ )

T1: nach Narkoseeinleitung, T2: 20 min nach Ende der EKZ, T3: 24 h postoperativ.

###  $p < 0,001$  vs. T2 [Darstellung: Mittelwert  $\pm$  SEM]

#### **4.3. Einfluss des NcoI RFLP im TNF- $\beta$ Gen auf die spontane und LPS – stimulierte Zytokinfreisetzung vor und nach Aortokoronarer Bypassoperation**

##### **4.3.1 TNF- $\alpha$**

Weder in den unstimulierten noch in den stimulierten Proben ergaben sich zu den jeweiligen Zeitpunkten Unterschiede bezüglich der TNF- $\alpha$  Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen. In beiden Gruppen waren nach LPS Stimulation hochsignifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel im Vergleich zu den unstimulierten Proben in den Vollblutansätzen nachweisbar.

Im Patientenserum (unstimulierte Proben) waren nur vereinzelt erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel messbar auch hier ergab ein Vergleich der Gruppen keine Unterschiede (Daten nicht dargestellt).

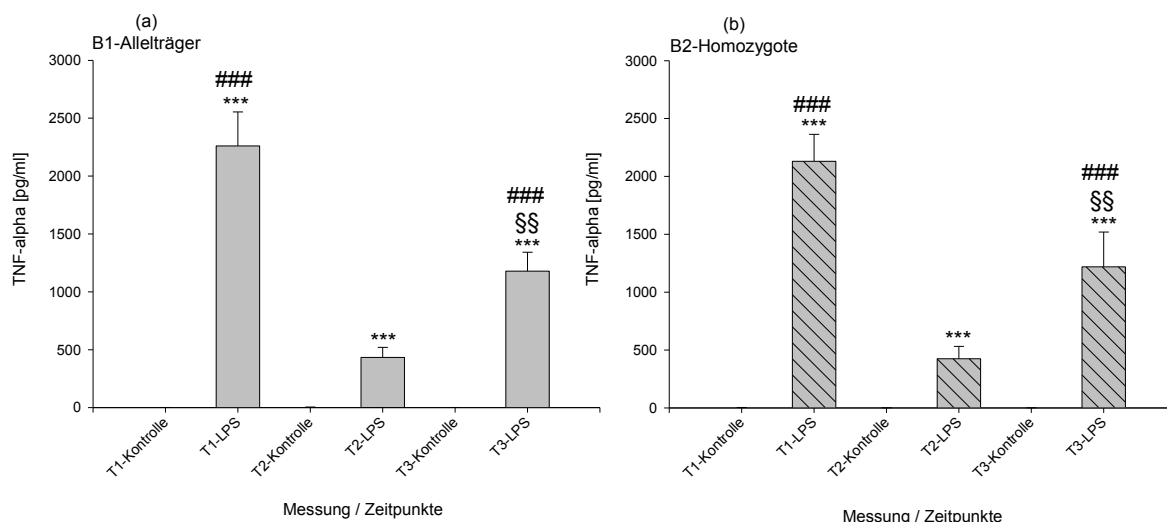


Abb. 4.3: TNF- $\alpha$  Ausschüttung nach LPS Stimulation vs. Kontrollen

a) TNF-B1 Allelträger (n=21); b) TNF-B2 Homozygote (n=19)

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; ###  $p < 0,001$  vs. T2; §§  $p = 0,002$  vs. T1; [Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM]

Im Vergleich zum Zeitpunkt T1 war die stimulierbare TNF- $\alpha$  Ausschüttung zum Zeitpunkt T2 signifikant herabgesetzt ( $p < 0,001$ ). Auch in den Vollblutansätzen zu T3 war die stimulierbare TNF- $\alpha$  Ausschüttung noch signifikant niedriger als präoperativ ( $p = 0,002$  T1 vs. T3). Diese Dynamik zeigten sowohl die TNF-B2 Homozygoten als auch die TNF-B1 Allelträger. (s. Abb. 4.3 und Tab. 4.3).

	TNF-B1 Allelträger	TNF-B2 Homozygote
<b>T1</b>	<b>2126pg/ml</b> (1301 - 2620)	<b>2191pg/ml</b> (1523 - 2499)
	<b>p = 0,957</b>	
<b>T2</b>	<b>275pg/ml</b> (129 - 634)	<b>299pg/ml</b> (79 - 559)
	<b>p = 0,665</b>	
<b>T3</b>	<b>1077pg/ml</b> (546 - 1741)	<b>727pg/ml</b> (531 - 1363)
	<b>p = 0,588</b>	

Tab. 4.3: TNF- $\alpha$  Konzentrationen nach LPS – Stimulation

Direkter Vergleich der TNF-B1 Allelträger (n=21) mit den TNF-B2 Homozygoten (n=19)

[Darstellung als Median (25% - 75% Perzentile)]

### 4.3.2 IL-10

In den unstimulierten Proben ließ sich in beiden Gruppen ein Anstieg der IL-10 Konzentrationen zum Zeitpunkt T2 im Vergleich zu T1 messen, in der Gruppe der TNF B1 Allelträger zeigte sich hierbei sogar aufgrund eines größeren Range eine statistische Signifikanz, während sich bei den TNF-B2 Homozygoten der Anstieg nur andeutete. Zum Zeitpunkt T3 waren bei beiden Gruppen die IL-10 Konzentrationen im Serum wieder rückläufig.

Beim direkten Vergleich der beiden Gruppen fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (s. Tab. 4.4).

	<b>TNF-B1 Allelträger</b>	<b>TNF-B2 Homozygote</b>
<b>T1</b>	<b>0,000pg/ml</b> (0,000 - 0,000)	<b>0,000pg/ml</b> (0,000 - 3,638)
	<b>p = 0,276</b>	
<b>T2</b>	<b>2,408pg/ml</b> (0,000 - 19,296)	<b>2,408pg/ml</b> (0,000 - 12,132)
	<b>p = 0,578</b>	
<b>T3</b>	<b>0,000pg/ml</b> (0,000 - 1,203)	<b>0,000pg/ml</b> (0,000 - 0,000)
	<b>p = 0,478</b>	

*Tab. 4.4: IL-10 Konzentrationen im Patientenserum*

*Vergleich der TNF-B1 Allelträger (n=21) mit den TNF-B2 Homozygoten (n=19)*

*[Darstellung als Median (25% - 75% Perzentile)]*

Nach LPS – Stimulation kam es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 Konzentrationen im Vollblutansatz im Vergleich mit den unstimulierten Proben.

Im Vergleich zu den zum Zeitpunkt T1 gemessenen Ausgangswerten kam es zum Zeitpunkt T2 bei den TNF-B2 Homozygoten zu einer Abnahme der stimulierbaren IL-10 Expression auf 51% des Ausgangswerts. In der Gruppe der TNF-B1 Allelträger fielen die Werte im Durchschnitt auf 32% der Ausgangswerte. Am postoperativen Tag (T3) war bei den TNF-B2 Homozygoten eine (in Relation zum Ausgangswert) auf 128% erhöhte stimulierbare IL-10 Expression zu beobachten ( $p < 0,05$  vs T1), wohingegen entsprechende Werte in der Gruppe der TNF-B1 Allelträger zum Zeitpunkt T3 eher wieder dem Ausgangsniveau angeglichen waren (s. Abb. 4.4).

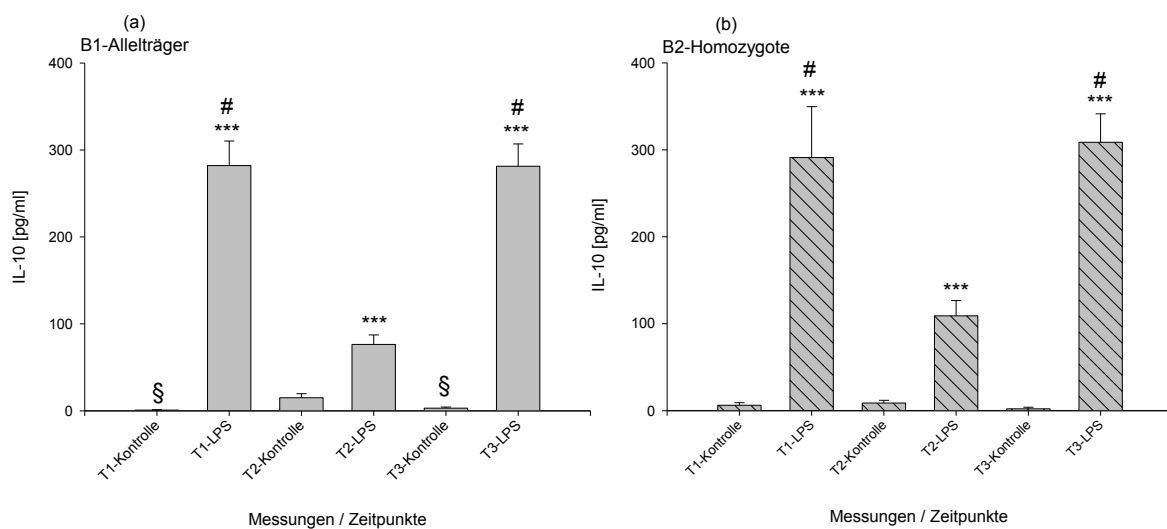


Abb. 4.4: IL-10 Ausschüttung nach LPS-Stimulation vs. Kontrollen

a) TNF- B1 Allelträger (n=21); b) TNF-B2 Homozygote (n=19);

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle ; #  $p < 0,05$  vs. T2-LPS; §  $p < 0,05$  vs. T2-Kontrolle;

[Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM])

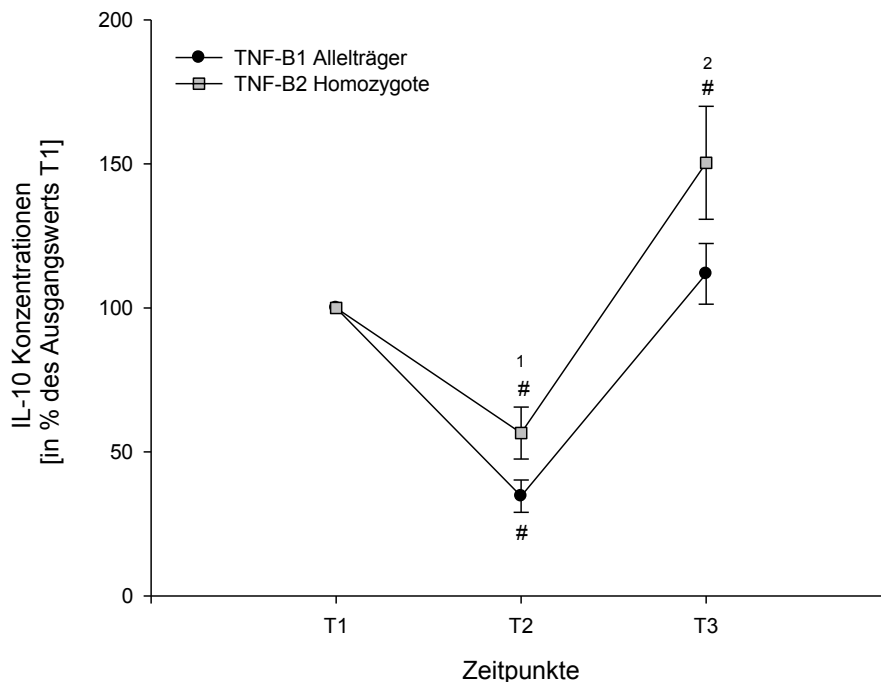


Abb.4.5: Zeitlicher Verlauf der LPS - stimulierten IL-10 Freisetzung relativ zu Ausgangswert T1

#  $p < 0,05$  vs. T1; 1  $p = 0,123$  vs. TNF-B1 Allelträger; 2  $p = 0,078$  vs. TNF-B1 Allelträger

[Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  SEM]

Im direkten Vergleich, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wenngleich zumindest eine Tendenz zu einer vermehrten IL-10 Produktion in den Vollblutansätzen der TNF-B2 Homozygoten zum Zeitpunkt T2 und T3 zu verzeichnen ist.(s.Tab.4.5).

	<b>TNF-B1 Allelträger</b>	<b>TNF-B2 Homozygote</b>
<b>T1</b>	<b>282,10±28,1pg/ml</b>	<b>291,20±58,5pg/ml</b>
	<b>p = 0,886 (<math>\alpha &lt; 0,8</math>)</b>	
<b>T2</b>	<b>76,30±11,0pg/ml</b>	<b>109,10±17,5pg/ml</b>
	<b>p = 0,116 (<math>\alpha &lt; 0,8</math>)</b>	
<b>T3</b>	<b>281,40±25,5pg/ml</b>	<b>308,50±32,7pg/ml</b>
	<b>p = 0,511 (<math>\alpha &lt; 0,8</math>)</b>	

*Tab.4. 5: IL-10 Konzentrationen nach LPS – Stimulation [Darstellung als Mittelwerte±SEM]*

### 4.3.3 IL-6

Im Vergleich zum Gesamtkollektiv zeigten die Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp im gesamten Verlauf keine Unterschiede im Bezug auf die IL-6 Antwort in den unstimulierten Vollblutanätzen. Sowohl bei den TNF-B1 Allelträgern als auch bei den TNF-B2 - Homozygoten kam es zum Zeitpunkt T2 zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentrationen im Vergleich zu T1. Dieser Trend setzte sich zum Zeitpunkt T3 noch weiter fort (s. Abb. 4.6)

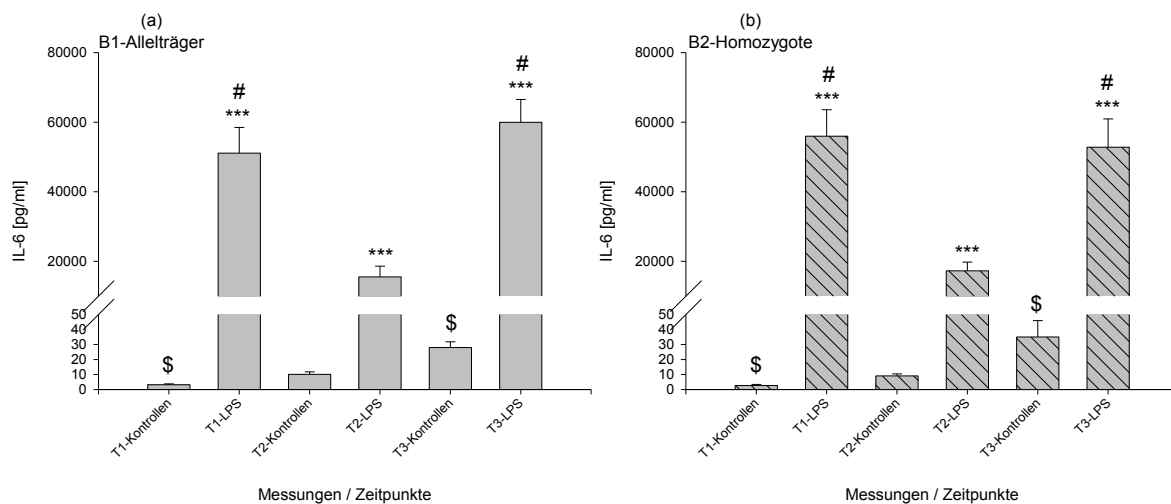


Abb.4. 6: IL-6 Ausschüttung nach LPS Stimulation vs. Kontrollen

a) TNF-B1 Allelträger (n=21); b) TNF-B2 Homozygote (n=19)

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; #  $p < 0,05$  vs. T2-LPS; \$  $p < 0,001$  vs. T2-Kontrollen;

[Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM] s.o.

Nach LPS – Stimulation kam es zu jedem der Zeitpunkte in beiden Gruppen zu einer hochsignifikanten Steigerung der IL-6 Ausschüttung ( $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle). Zum Zeitpunkt T2 wiederum war dann eine deutliche Verringerung der durch LPS stimulierbaren IL-6 Ausschüttung zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ). Auch hier zeigten beide Gruppen einen vergleichbaren Verlauf. Zum Zeitpunkt T3 waren schließlich in beiden Gruppen wieder mit T1 vergleichbare IL-6 Konzentrationen nach Stimulation zu messen.

Beim direkten Vergleich der nativen und LPS stimulierten IL-6 Ausschüttung zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

	<b>TNF-B1 Allelträger</b>	<b>TNF-B2 Homozygote</b>
<b>T1</b>	<b>39407pg/ml</b> (31907 - 57397)	<b>52310pg/ml</b> (25340 - 79198)
	<b>p = 0,533</b>	
<b>T2</b>	<b>9777pg/ml</b> (4664 - 25413)	<b>17817pg/ml</b> (10747 - 23624)
	<b>p = 0,660 (<math>\alpha &lt; 0,8</math>)</b>	
<b>T3</b>	<b>55422pg/ml</b> (36099 - 81187)	<b>42047pg/ml</b> (24452 - 63513)
	<b>p = 0,493 (<math>\alpha &lt; 0,8</math>)</b>	

Tab. 4.6: IL-6 Konzentrationen nach LPS – Stimulation [pg/ml] in Abhängigkeit vom TNF-B Genotyp  
[Darstellung als Median und 25%-75% Quantil]

#### 4.4 Einzelverläufe nach LPS Stimulation

Beim Vergleich der individuellen Werte einzelner Patienten waren z.T. sehr unterschiedliche Verläufe in der Zytokinantwort zu beobachten. So zeigten im Mittel alle Patienten zum Zeitpunkt T2 eine deutlich abgeschwächte Zytokinantwort nach LPS Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert T1 (vgl. Tab. 4.2). Bei insgesamt 5 Patienten kam es zum Zeitpunkt T2 jedoch nicht zu einer Verringerung, sondern sogar zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentrationen verglichen mit dem Zeitpunkt T1. Alle diese Patienten waren homozygot für das Allel TNF-B2 (s. Tab.4.7 und 4.8). Am häufigsten war dies für das Zytokin IL-10 zu beobachten.

<b>Patient (G)</b>	<b>TNF- <math>\alpha</math> Antwort [pg/ml]</b>		<b>IL-6 Antwort [pg/ml]</b>		<b>IL-10 Antwort [pg/ml]</b>		<b>Genotyp</b>
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	
<b>39</b>	347,4	358,96	17811,0	33313,0	70,7	53,83	B2B2
<b>21</b>	2296,99	322,4	14788,0	23984,0	121,81	136,39	B2B2
<b>24</b>	3183,22	1532,13	82771,0	18727,0	331,76	332,84	B2B2
<b>27</b>	4612,47	1227,20	67837,0	20927,0	153,18	160,47	B2B2
<b>30</b>	1648,91	136,57	40944,0	22372,0	152,91	187,62	B2B2

Tab. 4.7: Werte der „Ausreißer“ zu T2 nach LPS Stimulation (grau hinterlegt)

	<b>B1B1</b>	<b>B1B2</b>	<b>B2B2</b>
<b>Erhöhte Zytokinkonzentrationen nach LPS Stimulation zu T2 (T1 / T2 &lt; 1)</b>	0/4	0/17	5/19
<b>Erniedrigte Zytokinkonzentrationen nach LPS Stimulation zu T2 (T1 / T2 &gt; 1)</b>	4/4	17/17	14/19

Tab. 4.8: Verteilung der „Ausreißer“ zu T2, entsprechend ihres Genotyps



## **5. DISKUSSION**

### **5.1 Studienziel**

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) im Rahmen der koronaren Revaskularisationschirurgie kann postoperativ zu einem SIRS und infolgedessen sogar zum Multiorganversagen mit potenziell tödlichem Ausgang führen.

Dabei hat sich gezeigt, dass es nach Operationen unter Verwendung der HLM zu erhöhten Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Serum der Patienten kommen kann (HALL R I, 1997; WAN S, 1997). In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte weiterhin eine transiente Hemmung der Zytokinsynthesefähigkeit von Monozyten im in vitro stimulierten Vollblut nach koronaren Bypassoperationen nachgewiesen werden. (GRUNDMANN U, 2000). Dabei gab es jedoch starke intra- und interindividuelle Unterschiede bei der Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulation.

HEESEN und Mitarbeiter (2003) kamen in einer Studie mit gesunden Probanden zu dem Schluss, dass Polymorphismen in den Genen von TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  einen Einfluss auf das Ausmaß der endotoxinstimulierten Zytokinantwort in vitro haben könnten. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass es eine genetische Prädisposition geben müsste, die dafür verantwortlich ist, dass Patienten bei äußerlich vergleichbaren Konditionen, trotzdem unterschiedliche Immunreaktionen nach einem Reiz, wie z.B. einer Operation oder einem Trauma entwickeln.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus (LTA+252) auf die Zytokinantwort bei koronarchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation zu untersuchen. Insbesondere lag der Fokus auf der durch LPS stimulierbaren monozytären Ausschüttung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10.

### **5.2 Kritische Bewertung der Methodik**

#### **5.2.1 Patientenkollektiv**

Die in die Studie eingeschlossenen 40 Patienten repräsentierten ein typisches Kollektiv von Patienten zur aortokoronaren Revaskularisation mit den entsprechenden erkrankungsspezifischen Risikofaktoren. Anders als in bisherigen Studien wurden die Einschlusskriterien sehr weit formuliert. So wurden sowohl männliche als auch weibliche Patienten, im Alter zwischen 40 und 70 Jahren, in die Studie eingeschlossen.

Typische Risikofaktoren für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung wie Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hyperlipidämie und Hypertonie stellten kein Ausschlusskriterium dar.

Da in anderen Untersuchungen belegt werden konnte, dass Adipositas ein Risikofaktor für ein schlechteres Outcome nach ACVB Operationen darstellt und mit einem erhöhten Risiko für Wundinfektionen vergesellschaftet ist, wurden Patienten mit einem BMI  $>30\text{kg/m}^2$  nicht in die Studie eingeschlossen (RANUCCI M, 1999; RAHAMANIAN P B, 2007).

Des Weiteren wurden Medikamente, die nachgewiesen einen Effekt auf die Zytokinausschüttung haben, als Ausschlusskriterium formuliert, ebenso wie das Vorliegen einer malignen Grunderkrankung, endokrine Erkrankungen sowie exogene Hormonzufuhr. In ähnlich konzipierten Studien wurden ähnliche Ausschlusskriterien angewandt.

### 5.2.2 Demographische Daten

Durch die Analyse des Genotyps konnten 4 Patienten (10%) als homozygot für das Allel TNF-B1, 19 Patienten (47,5%) als homozygot für das Allel TNF-B2 und 17 Patienten (42,5%) als TNF-B1B2 Heterozygote identifiziert werden. Die Frequenz des Allels TNF-B1 betrug somit 0,31, die des Allels TNF-B2 0,69. Damit war die Verteilung der Genotypen vergleichbar mit bisher veröffentlichten Zahlen (MAJETSCHAK M, 1999; TOMASDOTTIR H, 2003).

Entsprechend ihres Genotyps wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Aufgrund der geringeren Allelfrequenz des TNF-B1 Allels und dem daraus resultierenden kleinen Anteil an TNF-B1 homozygoten Patienten im Gesamtkollektiv wurden in Anlehnung an frühere Studien alle TNF-B1 Allelträger in einer großen Gruppe zusammengefasst. MELDRUM et al zeigte 1999 in einer Studie, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis die TNF- $\alpha$  Konzentrationen bei TNF-B2 homozygoten Patienten signifikant höher waren als bei TNF-B1 Homozygoten und TNF-B1B2 Heterozygoten. Die Werte der Heterozygoten und TNF-B1 Homozygoten lagen in einem vergleichbaren Range und zeigten keine signifikanten Unterschiede. TOMASDOTTIR fasste daher 2003 ebenfalls alle TNF-B1 Allelträger in einer Gruppe zusammen.

Die beiden Gruppen unterschieden sich zwar entsprechend der Häufigkeit der Allele in ihrer Größe, jedoch nicht signifikant bezüglich der Merkmale Alter, BMI, linksventrikulärer Ejektionsfraktion oder des NYHA- und CCS – Stadiums. Auch beim Vergleich der Operationsdauer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei einer Untersuchung von 1570 kardiochirurgischen Patienten wurde das Merkmal „weibliches Geschlecht“ als unabhängiger Prädiktor für erhöhte postoperative Mortalität ermittelt (IBRAHIM, M.F. 2003). Interessanterweise befanden sich in der Gruppe der B2-Homozygoten signifikant mehr weibliche Patienten. Allerdings gibt es bislang keine publizierten Daten zur möglicherweise vorliegenden ungleichen Geschlechterverteilung der Genotypen.

Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass es einen geschlechtsspezifischen Unterschied bei der Zytokinantwort geben könnte (BAUER I, 2006). In einer prospektiven Studie an

52 Sepsispatienten konnten SCHRÖDER et. al (2003) zeigen, dass männliche Patienten in der Sepsis deutlich höhere TNF- $\alpha$  Spiegel und niedrigere IL-10 Spiegel aufwiesen als weibliche. Die Krankenhausmortalität der männlichen Patienten war in der genannten Studie deutlich höher als die der weiblichen. Weiterführend zeigte sich, dass die Assoziation zwischen Polymorphismen und unterschiedlicher Immunantwort ebenso wie das Langzeitüberleben von geriatrischen Patienten stark geschlechtsabhängig ist (CEDERHOLM T, 2007).

Die ungleiche Geschlechterverteilung ist daher eine Limitation der vorliegenden Studie und muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Zwar zeigte sich in den Daten der vorliegenden Arbeit auch in der Subgruppe der männlichen Patienten kein signifikanter Unterschied bezüglich der TNF- $\alpha$  und IL-10 Antwort (Daten nicht dargestellt) jedoch liegt hier ein methodischer Bias vor und ein Einfluss auf die Ergebnisse ist nicht ausgeschlossen.

Ebenso muss die unterschiedlich lange Aortenklammzeit und damit die unterschiedlich lange Ischämiezeit des Myokards berücksichtigt werden, da Myozyten selbst als Syntheseort von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 beschrieben sind. (MELDRUM D R, 2003; GASZ B, 2006). Die myokardiale Zytokinsynthese wird im ex vivo stimulierten Vollblut entsprechend nicht erfasst. In einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe hatten sich jedoch unter vergleichbaren Studienbedingungen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für die beschriebenen Zytokine im peripherarteriellen Blut im Vergleich mit Blutproben aus dem Coronarsinus ergeben (STOLL S, 2006), sodass der Anteil der Myozyten an der systemischen Inflamationsreaktion von uns nicht berücksichtigt wurde. Es gibt jedoch Autoren, die eine myokardiale Zytokinproduktion im Rahmen einer aortokaornaren Bypass Operation nachweisen konnten (KAWAMURA T, 2006) sodass eine Verzerrung der Ergebnisse hier nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Berücksichtigt werden muss hierbei insbesondere, dass die Gruppe der TNF-B2 Homozygoten eine signifikant kürzere Aortenklammzeit und damit eine kürzere myokardiale Ischämiezeit hatten. Es ist somit vorstellbar, dass die erhöhten postoperativen TNF- $\alpha$  Konzentrationen in dieser Gruppe wie sie in anderen Studien beschrieben worden waren, in unserem Kollektiv bei vergleichbaren Ischämiezeiten auch aufgetreten wären.

### 5.2.3 Messzeitpunkte

Die Messzeitpunkte wurden in Anlehnung an bereits durchgeführte Studien unserer Arbeitsgruppe gewählt. Die Zeitpunkte zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen und die Stimulation der Vollblutproben waren in beiden Gruppen gleich.

Limitierend muss angemerkt werden, dass trotz der Auswahl mehrerer repräsentativer Zeitpunkte für die Messungen Veränderungen der Zytokinkonzentrationen und eine andere Zytokinantwort zu anderen Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden können. Dies ist vor allem in Anbetracht der

kurzen biologischen Halbwertszeit der Zytokine relevant. Des Weiteren ist eine Beeinflussung der Konzentrationen und der Stimulierbarkeit durch Medikamentengabe und durch die Art der Sedierung im Rahmen der Narkoseführung nicht ausgeschlossen. In der Vergangenheit wurde mehrfach ein immunsuppressiver Effekt volatiler Anästhetika beschrieben. So führte insbesondere Sevofluran bei Patienten, die sich einer Bypassoperation unter Verwendung der HLM unterzogen, zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (EL AZAB S R, 2003; KAWAMURA T, 2006). Darüber hinaus wurden immunmodulatorische Effekte im Sinne einer gesteigerten Stimulierbarkeit mononukleärer Zellen in Bezug auf die TNF- $\alpha$ -Synthese nach Narkoseführung mit Propofol beschrieben (CHEN R M, 2005; HOFF G, 2001). Da die Narkoseführung in der vorliegenden Arbeit soweit wie möglich standardisiert war und Desfluran als volatiles Anästhetikum sowie Propofol während der HLM und bei allen Patienten in gleicher Weise verwendet wurden, ist ein Vergleich der Zytokine durchaus aussagekräftig.

#### **5.2.4 Messmethodik**

##### **Probenentnahme, Transport und Lagerung**

Das untersuchte Vollblut wurde in pyogenfreien Probenröhrchen abgenommen und direkt im Anschluss gekühlt ins Forschungslabor transportiert und weiterverarbeitet. Nach Abschluss der Experimente erfolgte eine Lagerung bei -80°C für maximal drei Monate. Mögliche Beeinflussungen der Messergebnisse durch Lagerung oder Transport können daher weitgehend ausgeschlossen werden.

##### **Vollblutansatz**

Die Versuche zur stimulierbaren Zytokinantwort wurden in Vollblutkulturen durchgeführt; ein Verfahren, das erstmals von Wilson und Mitarbeitern beschrieben wurde (WILSON B M, 1991). Die Entwicklung von Vollblutkulturen beruht auf der Beobachtung, dass mononukleäre Zellen nach Verdünnung von Vollblut mit Zellkulturmedium über mindestens 72h lebensfähig und funktionstüchtig bleiben. So betrug die mittels Trypanblau-Exklusion bestimmte Überlebensrate von mononukleären Zellen in Vollblutkulturen nach 24h über 95% und nach 72h noch über 82% (ERTEL W, 1995). In einer Versuchsreihe zur Stimulierbarkeit verschiedener Zytokine sowohl in durch Verdünnung mit RPMI Medium hergestellten Vollblutkulturen als auch in isolierten Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Vollblutkulturen für derartige Untersuchungen am besten geeignet sind, insbesondere im Hinblick auf die durch LPS stimulierte TNF- $\alpha$  Antwort (DE GROOTE D, 1992). Auch zeigte sich in einer anderen Studien, dass die Anwesenheit von Serum einen wesentlichen Kofaktor für die stimulierbare Zytokinantwort darstellt. Die TNF- $\alpha$ -Antwort fiel bei entsprechenden Untersuchungen ohne Serum wesentlich niedriger aus als mit Serum (KREUTZ M, 1997).

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Studie mit Vollblutkulturen ist somit, ähnlich der klinischen Realität, von der Anwesenheit entsprechender Serumfaktoren auszugehen.

Vollblutkulturen bieten also methodische Vorteile: Da die Zellen sich weiterhin in einem physiologischen Milieu befinden und sich das Verhältnis der verschiedenen Blutzellen untereinander nicht verändert, bleiben gegenseitige Regulationsmechanismen erhalten und Aktivierungsphänomene, die bei Zellisolationen auftreten, können ausgeschlossen werden (DE GROOTE D, 1992). Nicht erfasst bei diesem Verfahren werden allerdings die Zell-Zell-Interaktionen mit der Gefäßwand.

Vollblutkulturen haben sich bislang in einer Vielzahl von Studien zu Funktionsuntersuchungen von mononukleären Zellen bewährt (GRUNDMANN U, 2000; KLEINSCHMIDT S, 1998; CUENCA J, 2003; AL-HANBALI M, 2009).

### **Bakterientoxine**

Zur Stimulation der Zytokinantwort dienten in der vorliegenden Arbeit als gramnegativer Stimulus das Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* O111:B4. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Dosierung von 1 µg/ml LPS zu einer maximalen Zytokinstimulation führt. Andere Arbeitsgruppen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (ERTEL W, 1995; KREUTZ M, 1997; MITOV I G, 1997). Problematisch bei LPS Präparationen ist die mögliche Kontamination mit anderen Bakterienprodukten (REDL H, 1992). So konnte in einer Studie zur Signaltransduktion bei „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) gezeigt werden, dass eine Purifikation von LPS erforderlich war, um eine Kreuzreaktion mit einem, für grampositive Bakterienbestandteile verantwortlichen Rezeptortyp (TLR2) zu vermeiden (HIRSCHFELD M, 2000). Die genannten Kontaminationen können somit auch in der vorliegenden Studie nicht völlig ausgeschlossen werden, obwohl die LPS-Präparation von der höchsten erhältlichen Reinheit war.

### **Zytokine**

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 erfolgte ausschließlich mit kommerziell erhältlichen, spezifischen ELISA-Kits. Das Testprinzip beruht dabei auf einem quantitativen „Sandwich“-Enzymimmunoassay und gehört zu den Standardverfahren der Zytokinanalyse. Diese Technik hat gegenüber biologischen Assays den Vorteil einer sehr hohen Spezifität. Die Kreuzreaktionsrate wird hierbei mit unter 0,01% angegeben, während im biologischen Assay bestimmte Zellreaktionen auch von anderen Zytokinen ausgelöst werden können (ROCHE, 1999). Dagegen wird mit der ELISA-Technik die biologische Aktivität der Zytokine nicht erfasst. Um bei der Messung der Zytokinkonzentrationen die Werte im linearen Bereich der Standardkurve durchführen zu können, mussten stimulierte TNF- $\alpha$  und die IL-6

Proben verdünnt werden. Bei der anschließenden Konzentrationsberechnung wurde der Verdünnungsfaktor entsprechend berücksichtigt.

### **Genotypisierung**

Der Genotyp des NcoI RFLP im TNF- $\beta$  Gen wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und einem enzymatischen Verdau des PCR Produkts mit NcoI bestimmt.

Die Isolierung der DNA erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Quiagen, Hilden, Germany).

Das Protokoll für die Genotypisierung wurde in Anlehnung an das von STUEBER et al (1996) beschriebene Vorgehen erstellt. Die so ermittelten Allelfrequenzen waren mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar und entsprechen der bislang beschriebenen Allelverteilung in der Normalbevölkerung (MAJETSCHAK M, 1999; TOMASDOTTIR H, 2003).

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Unstimulierte Proben**

Dass es während und nach Operationen unter Verwendung der HLM zu einem Anstieg der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 im Serum der Patienten kommt, ist in der Literatur schon mehrfach beschrieben (McBRIDE W T, 1995, CREMER J, 1996). Übereinstimmend werden erhöhte Plasmaspiegel von IL-10 und IL-6 nach ACVB Operationen beschrieben. TNF- $\alpha$  konnte, wie auch im vorliegenden Fall, nicht oder nur in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden, was durch die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Messmethoden erklärt werden kann.

ABACILAR (2006) zeigte in einer Untersuchung von 20 koronarchirurgischen Patienten, dass es nicht einheitlich zur Erhöhung der TNF- $\alpha$  Serumspiegel bei Patienten nach kardiopulmonalem Bypass kommt. Jedoch waren erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel mit einem erhöhten Risiko für Nachblutungen und einer verlängerter Beatmungszeit assoziiert.

### **5.3.2 Stimulierte Proben**

Nach Stimulation der Blutproben mit LPS waren die Ergebnisse von Vorarbeiten reproduzierbar. So zeigten sich signifikant erhöhte Zytokinspiegel nach LPS Stimulation. Beim Vergleich der LPS induzierten Zytokinproduktion vor und nach EKZ fanden sich hochsignifikant niedrigere Zytokinspiegel 20min nach Beendigung der EKZ. Diese Zahlen stehen in Einklang mit der von GRUNDMANN et al 1998 beschriebenen Endotoxinresistenz humaner Monozyten nach kardiopulmonalem Bypass.

Eine Hemmung der Zytokin-Synthesefähigkeit wurde bereits für Patienten nach Polytrauma, im hämorrhagischen Schock und bei der Sepsis beschrieben (MAJETSCHAK M, 1999; ERTEL W, 1995; KEEL M, 1996).

Bei der schon länger bekannten Endotoxintoleranz im engeren Sinne kommt es durch vorherige Exposition mit geringen Endotoxindosen zu einer verminderten Reagibilität von Makrophagen bei erneuter Endotoxinexposition. Inwieweit es bei Operationen mit Verwendung der Herz-Lungen-Maschine zu einer Translokation von Endotoxin aus dem Splanchnikusgebiet kommt und dies zu der beschriebenen Endotoxintoleranz postoperativ beiträgt, wird noch kontrovers diskutiert. So konnten einige Autoren nach EKZ erhöhte systemische Endotoxinspiegel messen (ANDERSEN L W, 1987; AYDIN N B, 2003). Im Gegensatz dazu zeigen neuere Daten, dass eine perioperative Entfernung des Endotoxins mit Hilfe eines Filters in der Herz-Lungen-Maschine keinen Effekt auf die postoperativen TNF- $\alpha$  Serumspiegel hat (BLOOMQUIST S, 2009).

Die unter EKZ auftretende Hemmung der monozytären Zytokinsynthesefähigkeit ist bereits 20 bis 30min nach EKZ zu beobachten, wohingegen die Ausbildung der oben beschriebenen klassischen Endotoxintoleranz gewöhnlich mehrere Stunden benötigt. Des Weiteren ist hier, im Gegensatz zur verminderten Zytokinsynthese nach EKZ, keine Verminderung der HLA-DR Expression auf Monozyten festzustellen. Dies impliziert, dass die nach EKZ beobachteten Veränderungen zumindest nicht ausschließlich auf eine Endotoxinämie zurückzuführen sind. Darüber hinaus gibt es inzwischen Hinweise darauf, dass sowohl Medikamente, die peri- und postoperativ zum Einsatz kommen, wie Anästhetika und Katecholamine, als auch der Einsatz von Antibiotika einen immunmodulierenden Effekt haben. (LARSEN B, 1998; BAUER M, 1998; ZIEGELER S, 2006). Bei einem im Studienprotokoll nicht explizit vorgeschriebenen Flüssigkeitsmanagement im Verlauf der Operation und im postoperativen Verlauf ist ein gewisser Verdünnungseffekt durch einen unterschiedlichen Volumenbedarf der Patienten nicht ausgeschlossen. Vorangegangene Studien konnten jedoch einen Verdünnungseffekt als Ursache für verminderte Zytokinkonzentrationen postoperativ mittels FACS – Analyse weitgehend ausschließen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die verminderte Zytokinsynthesefähigkeit von Monozyten nach aortokoronarem Bypass bereits auf der Ebene der Gen-Expression nachweisen lässt (KLEINSCHMIDT S, 1998).

### **5.3.3 Der Einfluss des TNF- $\beta$ NcoI Polymorphismus auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung nach LPS-Stimulation**

STUEBER et al beschrieben 1996 zum ersten Mal erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Serum von TNF-B2 homozygoten Sepsispatienten. Darauf aufbauend konnte TOMASDOTTIR 2003 zeigen, dass nach Eingriffen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine das Kollektiv der TNF-B1 Allelträger niedrigere TNF- $\alpha$  Serumspiegel aufwies, als die TNF-B2 Homozygoten. Betrachtet man in der vorliegenden Untersuchung die TNF- $\alpha$  Spiegel nach LPS Stimulation im

Vollblutansatz, so zeigte sich zu keinem der drei Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den TNF-B1 Allelträgern und den TNF-B2 Homozygoten. Da sich o.g. Studien vor allem mit Serumspiegeln von Patienten (in vivo) befassten und die vorliegende Untersuchung vor allem die Serumspiegel nach LPS Stimulation (in vitro) vergleicht, kann man hier schlussfolgern, dass die beschriebenen Unterschiede auf einer von Monozyten unabhängigen TNF- $\alpha$  Produktion beruhen. Z.B. käme die schon zuvor diskutierte TNF- $\alpha$  Produktion von Parenchymzellen als weiterer Syntheseort und Ursache für die unterschiedliche Synthesefähigkeit infrage.

#### **5.3.4 Der Einfluss des TNF- $\beta$ NcoI Polymorphismus auf die IL-10 Ausschüttung nach LPS-Stimulation**

Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren scheint bei der Entwicklung postoperativer Komplikationen eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde in einer Studie eine überschießende IL-6 Produktion von Monozyten in vitro nach operativer Versorgung von Bauchaortenaneurysmen mit einem ungünstigen postoperativen Verlauf in Verbindung gebracht. Gleichzeitig wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe IL-10 und IL-6 Spiegel postoperativ für eine persistierende Suppression der monozytären TNF- $\alpha$  Ausschüttung und damit für die Entwicklung eines CARS verantwortlich sein könnten (ZIEGENFUSS T, 1999).

Vergleicht man diesbezüglich die Gruppe der TNF-B1 Allelträger mit der Gruppe der TNF-B2 Homozygoten, so fällt auf, dass es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der monozytären IL-10 Synthesefähigkeit nach EKZ kommt. Während es in der Gruppe der TNF-B2 Homozygoten jedoch auf einen Abfall der IL-10 Syntheseleistung auf 52% des Ausgangswertes kommt, ist diese in der Gruppe der B1-Allelträger mit 31% deutlich stärker ausgeprägt.

Zum Zeitpunkt T3, also 24h nach EKZ, kommt es nach LPS Stimulation im Kollektiv der TNF-B2 Homozygoten zu einer signifikant erhöhten IL-10 Ausschüttung in Relation zum Ausgangswert, während in der Gruppe der TNF-B1 Allelträger IL-10 Konzentrationen zu messen sind, die mit dem Ausgangswert vergleichbar sind. Diese überschießende IL-10 Ausschüttung postoperativ bei TNF-B2 homozygoten Patienten kann als ein Baustein in der Pathophysiologie komplizierter postoperativer Verläufe im Sinne eines CARS gesehen werden und steht im Einklang mit der Beobachtung, dass der TNF- $\beta$  Polymorphismus einen Risikofaktor für die postoperative Sepsis darstellt (WATANABE E, 2009). Dass der TNF-B2 Genotyp einen Risikofaktor für postoperative Komplikationen nach aortokoronarem Bypass darstellt, ist jedoch bislang nicht belegt.

Da die Gruppe der TNF-B1 Allelträger signifikant längere Aortenklemmzeiten aufwies und beim direkten Vergleich der absoluten IL-10 Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zu messen



war, ist die Beobachtung jedoch nur als Hinweis auf einen möglicherweise vorhandenen Unterschied zu werten und statistisch nur eingeschränkt aussagekräftig.

Bislang gibt es keine weiteren Daten, die auf eine unterschiedliche, durch Endotoxin stimulierte IL-10 Ausschüttung in Abhängigkeit vom TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus nach EKZ hinweisen.

### **5.3.5 Der Einfluss des TNF- $\beta$ NcoI Polymorphismus auf die IL-6 Ausschüttung nach LPS-Stimulation**

IL-6 ist inzwischen ein Parameter, der im klinischen Alltag zur Beurteilung einer inflammatorischen Reaktion immer häufiger verwendet wird und dessen Rolle bei SIRS und Sepsis gut belegt ist (VENTETUOLO C E, 2008; BRUNKHORST F M, 2008).

Postoperativ konnten in der vorliegenden Studie im Gesamtkollektiv der Patienten signifikant erhöhte IL-6 Level nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu IL-10 und TNF- $\alpha$  war 24h postoperativ ein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Dies entspricht Beobachtungen aus bisherigen Studien, dass IL-6 im Vergleich zu TNF- $\alpha$  im Rahmen von Entzündungsreaktionen erst später ansteigt und zudem eine längere Halbwertszeit aufweist. (SHALBY M R, 1989; WATANABE E, 2005).

Beim direkten Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich kein Unterschied bezüglich der IL-6 Konzentrationen zu allen Zeitpunkten.

### **5.3.6 Ausreißer**

Obwohl die Depletion der monozytären Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulation im Anschluss an die EKZ sowohl mit den vorliegenden Daten, als auch in anderen Untersuchungen wiederholt nachgewiesen werden konnte, zeigten insgesamt fünf Patienten aus dem Gesamtkollektiv diesbezüglich auffällig andere Verläufe. So konnte bei einem Patienten zum Zeitpunkt T2 leicht erhöhte TNF- $\alpha$  und IL-6 Werte nach LPS Stimulation im Vergleich zu T1 gemessen werden. Bei einem weiteren Patienten war das gleiche Phänomen bei den Zytokinen IL-6 und IL-10 zu beobachten. Drei weitere Patienten zeigten erhöhte IL-10 Konzentrationen nach LPS Stimulation im Vergleich mit T1. Auffällig ist, dass alle fünf beschriebenen Patienten homozygot für das TNF-B2 Allel sind. MAJETSCHAK et al beschrieben 2005 ein ähnliches Phänomen bei Patienten nach orthopädischen Operationen.

#### **5.4 Diskussion der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Datenlage**

Im PIRO-Modell der Sepsis sind im letzten Jahrzehnt vermehrt genetische Polymorphismen in den Fokus klinischer Studien gerückt, um die Prädisposition einzelner Individuen für das Auftreten eines SIRS oder einer Sepsis bzw. deren Outcome abschätzen zu können. So sind unter anderem Polymorphismen des humanen TNF- $\alpha$  Gens mit unterschiedlichen Verläufen bei Infektionen assoziiert. Neben einem Polymorphismus an Position -308 des TNF- $\alpha$  Gens scheint auch der NcoI Polymorphismus in der Promotorregion des TNF- $\beta$  Gens (LTA +252) eine Rolle zu spielen. Es gibt bislang einige Hinweise darauf, dass der NcoI Polymorphismus im TNF- $\beta$  Gen mit dem Auftreten und einem ungünstigen Verlauf septischer Krankheitsbilder assoziiert ist. Dabei konnte der Genotyp TNF-B2/B2 in mehreren Studien sowohl mit höheren TNF- $\alpha$  Spiegeln als auch mit einer erhöhten Sepsis Inzidenz und einer damit verbundenen erhöhten Letalität in Verbindung gebracht werden.

FLACH et al fanden im Bezug auf die Entwicklung einer Sepsis bei Polytrauma Patienten ein höheres Risiko für TNF-B2 homozygote Patienten und darüber hinaus auch eine höhere Zytokin-Synthesekapazität für TNF $\alpha$ , IL6 und IL-8 im ex vivo LPS-stimulierten Vollblut von septischen Patienten. Andere Studien hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Endotoxin stimulierten TNF- $\alpha$  Synthesekapazität und der Entwicklung bzw. dem Verlauf einer Sepsis belegen (CAVAILLON J M 2003; CALVANO J E 2003).

WATANABE et al konnten 2009 zeigen, dass der TNF- $\beta$  Polymorphismus einen Risikofaktor für die postoperative Sepsis darstellt und dass durch gleichzeitiges Auftreten der genetischen Prädisposition zusammen mit weiteren Faktoren wie männliches Geschlecht und hohes Alter bei TNF-B2 homozygoten Patienten das Risiko für die Entwicklung einer Sepsis überproportional verstärkt wird.

In Zusammenschau aller Studien muss man aktuell davon ausgehen, dass der TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus zumindest als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Sepsis angesehen werden kann und dass dies wahrscheinlich mit einer erhöhten TNF- $\alpha$  Synthese im Rahmen der Sepsis bei TNF-B2 homozygoten Patienten in Zusammenhang steht.

Die Bedeutung genetischer Polymorphismen für den postoperativen Verlauf kardiochirurgischer Patienten ist bislang nicht geklärt. RIHA et al fanden keinen Unterschied bezüglich der Liegezeit auf der Intensivstation, oder der Beatmungsdauer, daneben ebenso keine Veränderungen im Serum-Lactat in Abhängigkeit vom TNF- $\beta$  Polymorphismus und einem weiteren Polymorphismus im IL-10 Gen (RIHA H, 2006).

Dagegen fand sich bei der Untersuchung von 262 Bypass Patienten hinsichtlich des TNF $\alpha$  -308 und des TNF $\beta$  +250 Polymorphismus (hier bislang als TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus bezeichnet)

ein Zusammenhang: Es zeigten sich für den +250G/-308G Haplotyp signifikant längere Beatmungszeiten, jedoch ohne Einfluss auf Blutungskomplikationen oder Mortalität (YENDE S, 2003).

Bezüglich der Auswirkung auf die postoperative Zytokinausschüttung zeigte bislang lediglich eine einzelne Arbeitsgruppe, dass die TNF- $\alpha$  Serumspiegel in der Gruppe der TNF-B2 Homozygoten signifikant höher lagen als in der Gruppe der B1-Allelträger (TOMASDOTTIR H, 2003). Beim Vergleich von kardiochirurgischen Eingriffen mit und ohne Einsatz der HLM war zwar in einer weiteren Arbeit zu beobachten, dass es bei den TNF-B2 Homozygoten nach EKZ zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$  und IL-8 Spiegel kommt, ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der einzelnen Allelträger ergab sich jedoch auch hier nicht (SCHRÖDER S, 2003).

Nach den Daten der vorliegenden Studie scheint der TNF- $\beta$  Polymorphismus keinen Einfluss auf die Endotoxinsensitivität von in vitro stimulierten Monozyten zu haben. Sowohl die präoperativ maximale Stimulation mit LPS, als auch die postoperative Endotoxinresistenz konnte in beiden Gruppen vergleichbar dargestellt werden. MAJETSCHAK kam 2005 zu einem ähnlichen Ergebnis bei Patienten nach orthopädischen Eingriffen. Hier zeigte sich bezüglich der Endotoxinsensitivität vor und 24h nach dem chirurgischen Trauma kein direkter Unterschied beim Vergleich der Genotypen TNF-B1 und B2. Auch bei der Untersuchung der LPS induzierten Zytokinproduktion bei Sarkoidosepatienten zeigte sich keine Assoziation zwischen dem TNF $\alpha$  - 308 und dem TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus und der monozytären Zytokinantwort nach Stimulation (SOMOSKÖVI A, 1999).

Die bislang beschriebenen erhöhten Zytokinspiegel im Patientenserum müssen demnach also durch einen, von Endotoxin unabhängigen Mechanismus zustande kommen. So spielen sicher die, in der vorliegenden Studie nicht erfasste monozytäre Aktivierung an Fremdoberflächen der Herz-Lungen-Maschine eine Rolle. Des Weiteren kommt es durch das Ischämie – Reperfusionseignis im Rahmen der Operation zu einer Aktivierung von Kardiomyozyten und anderen Parenchymzellen, die ebenfalls als Syntheseort von TNF- $\alpha$  in die Aktivierung der Zytokinkaskade eingreifen können (WAN S, 1996, MELDERUM D R, 2002). Inwieweit der TNF- $\beta$  NcoI Polymorphismus mit einer veränderten myokardialen Zytokinproduktion oder einer vermehrten Aktivierung von Monozyten an Fremdmaterialien assoziiert ist, wurde bislang nicht untersucht.

#### **5.4 Schlussfolgerung**

Bei Operationen unter Zuhilfenahme der EKZ wurde neben der inflammatorischen Reaktion des Organismus auch eine kompensatorische antiinflammatorische Reaktion mit Beeinträchtigung der humoralen und der kurzfristigen zellulären Immunität beschrieben. Die vorliegenden Daten zeigen erneut, dass es nach EKZ zu einer hochsignifikanten Suppression der monozytären Zytokinproduktion nach Endotoxinstimulation kommt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass aortokoronare Bypassoperationen unter Verwendung der EKZ zu erhöhten Serumspiegeln von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen führen. Vor allem das proinflammatorische Zytokin IL-6, das mehr und mehr als klinischer Marker zur Diagnostik und Verlaufskontrolle bei Sepsispatienten verwendet wird, ist bereits 20min nach EKZ signifikant erhöht und steigt innerhalb der ersten 24h postoperativ weiter an. Diese Beobachtungen sind, wenngleich nicht neu, von wesentlicher Bedeutung zum Verständnis des SIRS und der Sepsis im Sinne der „Host Response“ im PIRO-Modell.

Der untersuchte TNF- $\beta$  Polymorphismus hat nach den Daten der vorliegenden Studien keinen signifikanten Einfluss auf die Endotoxinsensitivität von in vitro stimulierten Monozyten bezüglich der TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion.

Für das TNF-B2 Allel homozygote Patienten scheinen jedoch zu einer überschießenden IL-10 Ausschüttung nach aortokoronarem Bypass zu neigen. Gleichzeitig weisen diese Patienten im Gegensatz zu den TNF-B1 Allelträgern überzufällig häufig eine, abweichend vom Gesamtkollektiv, erhöhte postoperative Endotoxinsensibilität auf. Dies legt den Schluss nahe, dass das TNF-B2 Allel bei der Entstehung eines Ungleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischer Reaktion im postoperativen Verlauf angesehen werden kann und so möglicherweise als ein potenzieller Risikofaktor für die Entwicklung eines postoperativen SIRS oder CARS anzusehen ist.

## **5.6 Ausblick**

Nachdem in den letzten Jahren viele Studien über Assoziationen einzelner genetischer Polymorphismen mit dem Auftreten und dem Outcome verschiedener Erkrankungen durchgeführt wurden, erscheint vor allem im Bereich der Sepsisforschung zunehmend evident, dass das Interesse mehr auf das gemeinsame Auftreten mehrerer Polymorphismen gelenkt werden sollte. Es sind daher weitere große Studien nötig, um eine eindeutige klinische Relevanz genetischer Polymorphismen zu belegen oder das Auftreten von sogenannten Haplotypen bei bestimmten Krankheitsbildern herauszuarbeiten. Für die Sepsis wird dies aktuell in der GENOSEPT-Studie (Genetics of sepsis and septic shock) versucht: In dieser multinationalen Studie, die 2005 von der Europäischen Gesellschaft für Intensivmedizin (ESICM) ins Leben gerufen wurde, werden Sepsispatienten nach einheitlichen Kriterien stratifiziert und eine Vielzahl genetischer Polymorphismen bestimmt.

Des Weiteren ist bislang nicht geklärt, inwieweit die Assoziation genetischer Polymorphismen mit dem Auftreten von Erkrankungen oder physiologischen Veränderungen einen kausalen Zusammenhang bilden. So sind die eigentlichen Mechanismen, die z.B. vom TNF-B2 homozygoten „Genotyp“ zum TNF- $\alpha$  „high producer“ Phänotyp führen, bislang nicht verstanden, sondern lediglich als „Assoziation“ beschrieben. Dies wird in den nächsten Jahren Gegenstand

weiterer Forschung sein müssen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Erforschung genetische Polymorphismen lediglich ein kleines Puzzleteil beim Versuch, das Krankheitsbild der Sepsis und abakterielle postoperative Entzündungsreaktionen in der Gesamtheit zu verstehen.

## **6. LITERATUR**

- 1.) Al-Hanbali M, Ali D, Bustami M, Abdel-Malek S, Al-Hanbali R, Alhussainy T, Qadan F, Matalka KZ. Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kappaB nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009 Mar;30(1):131-8.
- 2.) Allen ML, Hoschtitzky JA, Peters MJ, Elliott M, Goldman A, James I, Klein NJ. Interleukin-10 and its role in clinical immunoparalysis following pediatric cardiac surgery. *Crit Care Med.* 2006 Oct;34(10):2658-65.
- 3.) Andersen LW, Baek L, Degn H, Lehd J, Krasnik M, Rasmussen JP. Presence of circulating endotoxins during cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 Jan;93(1):115-9.
- 4.) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7):1303-10.
- 5.) Aydin NB, Gercekoglu H, Aksu B, Endotoxemia in coronary artery bypass surgery: A comparison of the off-pump technique and conventional cardiopulmonary bypass, *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (2003), p. 843
- 6.) Baron RM, Baron MJ, Perrella MA. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Feb;34(2):129-34
- 7.) Bauer I, Bauer M, Raddatz A, Luedtke C, Werth M, Silomon M, Rensing H, Wilhelm W. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients with severe sepsis. *Anaesthesist.* 2006 May;55(5):515-27
- 8.) Bauer M, Rensing H, Ziegenfuss T. Anesthesia and perioperative immune function *Anaesthesist.* 1998 Jul;47(7):538-56
- 9.) Beutler B, Poltorak A. The sole gateway to endotoxin response: how LPS was identified as Tlr4, and its role in innate immunity. *Drug Metab Dispos.* 2001 Apr;29(4 Pt 2):474-8.
- 10.) Blomquist S, Gustafsson V, Manolopoulos T, Pierre L. Clinical experience with a novel endotoxin adsorption device in patients undergoing cardiac surgery. *Perfusion.* 2009 Jan;24(1):13-7.
- 11.) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee.

- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.
- 12.) Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996 Jul;24(7):1125-8
  - 13.) Bouter H, Schippers EF, Luelmo SA, Versteegh MI, Ros P, Guiot HF, Frölich M, van Dissel JT. No effect of preoperative selective gut decontamination on endotoxemia and cytokine activation during cardiopulmonary bypass: a randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med*. 2002 Jan;30(1):38-43.
  - 14.) Brunkhorst FM. Sepsismar—r—what is useful? *Dtsch Med Wochenschr*. 2008 Nov;133(48):2512-5.
  - 15.) Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gliuca F, Luciani N, Zamparelli R, Schiavello R, Donati MB, Maseri A, Possati G, Andreotti F. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol*. 2001 Nov 15;88(10):1125-8.
  - 16.) Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1259-64.
  - 17.) Chen RM, Chen TG, Chen TL, Lin LL, Chang CC, Chang HC, Wu CH (2005) Anti-inflammatory and antioxidative effects of propofol on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 1042: 262-71
  - 18.) Cederholm T, Persson M, Andersson P, Stenvinkel P, Nordfors L, Madden J, Vedin I, Wretling B, Grimble RF, Palmblad J. Polymorphisms in cytokine genes influence long-term survival differently in elderly male and female patients. *J Intern Med*. 2007 Aug;262(2):215-23.
  - 19.) Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 1996 Jun;61(6):1714-20.
  - 20.) Cuenca J, Cuchacovich M, Pérez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, Soto L, Cruzat A, Salazar-Onfray F, Aguillón JC. The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Feb;42(2):308-13.
  - 21.) Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep*. 2005 Sep;7(5):329-34.
  - 22.) De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F,

- Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*. 1992 May;4(3):239-48.
- 23.) Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007 May;35(5):1244-50.
- 24.) El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ, Groeneveld AB, Van Strik R, Van Wijk EM, Scheffer GJ Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol* 2003 20: 380-4
- 25.) Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007 Apr;33(4):606-18.
- 26.) Engelmann H, Novick D, Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem*. 1990 Jan 25;265(3):1531-6
- 27.) Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995 Mar 1;85(5):1341-7.
- 28.) Farmer TW, The Jarisch-Herxheimer-reaction in early syphilis treated with crystalline penicillin G. *J Clin Invest*. 1948 Jul;27(4):532
- 29.) Galley HF, Lowe PR, Carmichael RL, Webster NR. Genotype and interleukin-10 responses after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth*. 2003 Sep;91(3):424-6.
- 30.) Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di Castelnuovo A, Nasso G, Burzotta F, Iacoviello L, Donati MB, Schiavello R, Maseri A, Possati G. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation*. 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II195-9.
- 31.) Gasz B, Lenard L, Racz B, Benko L, Borsiczky B, Cserepes B, Gal J, Jancso G, Lantos J, Ghosh S, Szabados S, Papp L, Alotti N, Roth E (2006) Effect of cardiopulmonary bypass on cytokine network and myocardial cytokine production. *Clin Cardiol* 29: 311-5
- 32.) Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology*. 1995 Apr;82(4):1026-60.
- 33.) Gerlach H. From Roger Bone to PIRO. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed*



- Schmerzther. 2006 Jan;41(1):32-4.
- 34.) Grundmann U, Rensing H, Adams HA, Falk S, Wendler O, Ebinger N, Bauer M. Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors. *Anesthesiology*. 2000 Aug;93(2):359-69.
  - 35.) Hake U, Dahm M, Böning A, Massoudy P, Schmitz C, Tzanova I. Koronaroperationen ohne Herz-Lungen-Maschine *Dtsch Arztebl* 2007; 104(30): A-2127 / B-1880 / C-1816
  - 36.) Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*. 1997 Oct;85(4):766-82.
  - 37.) Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J; Geneva Sepsis Network. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1;164(3):396-402.
  - 38.) Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: Association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med*. 2003 Jan;31(1):211-4.
  - 39.) Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):618-22.
  - 40.) Hoff G, Bauer I, Larsen B, Bauer M (2001) Modulation of endotoxin-stimulated TNF-alpha gene expression by ketamine and propofol in cultured human whole blood. *Anaesthesist* 50: 494-9
  - 41.) Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
  - 42.) Ibrahim MF, Paparella D, Ivanov J, Buchanan MR, Brister SJ. Gender-related differences in morbidity and mortality during combined valve and coronary surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Oct;126(4):959-64.
  - 43.) Inohara N, Ogura Y, Nuñez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Feb;5(1):76-80.
  - 44.) Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. *J Infect Chemother*. 2000 Mar;6(1):51-60.
  - 45.) Jawa RS, Kulaylat MN, Baumann H, Dayton MT. What is new in cytokine research related to trauma/critical care. *J Intensive Care Med*. 2006 Mar-Apr;21(2):63-85

- 
- 46.) Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S, Wei J, Inada K (2006) Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 20: 503-8
- 47.) Keel M, Schrezenberger N, Steckholzer U, Ungethüm U, Kenney J, Trentz O, Ertel W. Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *J Trauma*. 1996 Sep;41(3):430-7
- 48.) Kleinschmidt S, Wanner GA, Bussmann D, Kremer JP, Ziegenfuss T, Menger MD, Bauer M. Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline. *Shock*. 1998 Jan;9(1):12-20.
- 49.) Kollef MH, Wragge T, Pasque C. Determinants of mortality and multiorgan dysfunction in cardiac surgery patients requiring prolonged mechanical ventilation. *Chest*. 1995 May;107(5):1395-401.
- 50.) Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, Krause SW, Riedel D, Bessler W, Andreesen R. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology*. 1997 Nov;92(3):396-401.
- 51.) Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997 Apr;34(5):391-9.
- 52.) Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*. 2002 Jul;97(1):215-52.
- 53.) Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W. Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis*. 1996 Mar;173(3):661-8.
- 54.) Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology*. 1998 Nov;89(5):1218-27
- 55.) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003 Apr;29(4):530-8. Epub 2003 Mar 28. Review
- 56.) Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*. 1998 Sep;113(3):401-6.

- 
- 57.) Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade FU, Stüber F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg.* 1999 Aug;230(2):207-14.
- 58.) Majetschak M, Krehmeier U, Ostroverkh L, Blömeke B, Schäfer M. Alterations in leukocyte function following surgical trauma: differentiation of distinct reaction types and association with tumor necrosis factor gene polymorphisms. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Feb;12(2):296-303.
- 59.) Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B, Heesen M. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Nov;9(6):1205-11.
- 60.) McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *Br J Anaesth.* 1995 Dec;75(6):724-33.
- 61.) McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 1994 Oct 6;371(6497):508-10.
- 62.) Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Ayala A, Cain BS, Shames BD, Ao L, Banerjee A, Harken AH. Human myocardial tissue TNFalpha expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Sep;30(9):1683-9.
- 63.) Meldrum DR, Partrick DA, Cleveland JC Jr, Shenkar R, Meldrum KK, Raiesdana A, Ayala A, Brown JW, Harken AH. On-pump coronary artery bypass surgery activates human myocardial NF-kappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Surg Res.* 2003 Jun 15;112(2):175-9. Erratum in: *J Surg Res.* 2003 Dec;115(2):345
- 64.) Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 1991 Jan 1;173(1):209-19.
- 65.) Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Eisenburg J, Scholz S, Albert ED, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Allelic variation in the TNF-beta gene does not explain the low TNF-beta response in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol.* 1991 Dec;34(6):735-40.
- 66.) Mitov IG, Kropec A, Benzing A, Just H, Garotta G, Galanos C, Freudenberg M. Differential cytokine production in stimulated blood cultures from intensive care patients with bacterial infections. *Infection.* 1997 Jul-Aug;25(4):206-12.

- 
- 67.) Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 1985 Sep 11;13(17):6361-73.
- 68.) Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock.* 2005 Jun;23(6):488-93.
- 69.) Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000 Apr;117(4):1162-72.
- 70.) Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):943-52.
- 71.) Rahmanian PB, Adams DH, Castillo JG, Chikwe J, Bodian CA, Filsoufi F. Impact of body mass index on early outcome and late survival in patients undergoing coronary artery bypass grafting or valve surgery or both. *Am J Cardiol.* 2007 Dec 1;100(11):1702-8.
- 72.) Ranucci M, Cazzaniga A, Soro G, Morricone L, Enrini R, Caviezel F. Obesity and coronary artery surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1999 Jun;13(3):280-4.
- 73.) Redl H, Bahrami S, Leichtfried G, Schlag G. Special collection and storage tubes for blood endotoxin and cytokine measurements. *Clin Chem.* 1992 May;38(5):764-5.
- 74.) Rensing H, Bauer M. Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies *Anaesthesist.* 2001 Nov;50(11):819-41
- 75.) Rensing H. Endotoxins. Pathogenetic meaning of sepsis *Anaesthesist.* 2003 Dec;52 Suppl 1:S7-S13.
- 76.) Riha H, Hubacek JA, Poledne R, Kellovsky P, Brezina A, Pirk J. IL-10 and TNF-beta gene polymorphisms have no major influence on lactate levels after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Jul;30(1):54-8. Epub 2006 May 24
- 77.) Saadia R, Schein M. Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model? *J Accid Emerg Med.* 1999 May;16(3):163-6;
- 78.) Sablotzki A, Börgermann J, Baulig W, Friedrich I, Spillner J, Silber RE, Czeslick E. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and markers of acute-phase response in patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following open heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct;49(5):273-8.
- 79.) Sablotzki A, Mann V, Simm A, Czeslick E. Changes in the cytokine network through escalating SIRS after heart surgery. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001 Sep;36(9):552-9

- 
- 80.) Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 15;168(4):476-80.
- 81.) Schade FU, Stüber F, Börgermann J, Majetschak M. Relation of the bi-allelic NcoI restriction fragment length polymorphism within the tumour necrosis factor B gene to the development of mediastinitis. *Eur J Surg Suppl*. 1999;(584):73-8.
- 82.) Schroeder S, Börger N, Wrigge H, Welz A, Putensen C, Hoeft A, Stüber F. A tumor necrosis factor gene polymorphism influences the inflammatory response after cardiac operation. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):534-7.
- 83.) Schuster HP, Engelmann L, Diagnostik und Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Springer, 2006. ISBN 3798517282, 9783798517288
- 84.) Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1995 Apr;25(4):1129-32.
- 85.) Smith JW, Gamelli RL, Jones SB, Shankar R. Immunologic responses to critical injury and sepsis. *J Intensive Care Med*. 2006 May-Jun;21(3):160-72
- 86.) Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem*. 1987 May 25;262(15):6951-4.
- 87.) Somoskövi A, Zissel G, Seitzer U, Gerdes J, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine*. 1999 Nov;11(11):882-7.
- 88.) Spanier T, Tector K, Schwartz G, Chen J, Oz M, Beck J, Mongero L. Endotoxin in pooled pericardial blood contributes to the systemic inflammatory response during cardiac surgery. *Perfusion*. 2000 Sep;15(5):427-31.
- 89.) Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 1996 Mar;24(3):381-4.
- 90.) Tabrizi AR, Zehnbauser BA, Freeman BD, Buchman TG. Genetic markers in sepsis. *J Am Coll Surg*. 2001 Jan;192(1):106-17 Erratum in: *J Am Coll Surg* 2001 Mar;192(3):424.
- 91.) Taylor KM. SIRS--the systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 1996 Jun;61(6):1607-8

- 
- 92.) Tomasdottir H, Hjartarson H, Ricksten A, Wasslavik C, Bengtsson A, Ricksten SE. Tumor necrosis factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesth Analg*. 2003 Oct;97(4):944-9
- 93.) Van der Poll T, Jansen J, Levi M, ten Cate H, ten Cate JW, van Deventer SJ. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med*. 1994 Nov 1;180(5):1985-8.
- 94.) Vazquez-Jimenez JF, Liakopoulos OJ, Qing M, Messmer BJ, Seghaye MC (2002) Tumor necrosis factor-alpha and troponin I release in porcine cardiac lymph and coronary sinus blood before and after cardiopulmonary bypass. *Lymphology* 35: 105-13
- 95.) Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med*. 2008 Dec;29(4):591-603
- 96.) Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Sep;112(3):806-11.
- 97.) Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*. 1997 Sep;112(3):676-92.
- 98.) Watanabe E, Buchman TG, Hirasawa H, Zehnbauser BA, Association between lymphotoxin-alpha (tumor necrosis factor-beta) intron polymorphism and predisposition to severe sepsis is modified by gender and age. *Crit Care Med*. 2009 Sep 28. [Epub ahead of print]
- 99.) Waxman K. Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. *New Horiz*. 1996 May;4(2):153-60
- 100.) Webb GC, Chaplin DD. Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J Immunol*. 1990 Aug 15;145(4):1278-85.
- 101.) Westaby S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med*. 1987;13(2):89-95.
- 102.) Wilson BM, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P. A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumour necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods*. 1991 Jun 3;139(2):233-40.
- 103.) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.

- 
- 104.) Wunderink RG, Waterer GW, Cantor RM, Quasney MW. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and the variable presentation and outcome of community-acquired pneumonia. *Chest*. 2002 Mar;121(3 Suppl):87S.
- 105.) Wunderink RG, Waterer GW. Genetics of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005 Dec;26(6):553-62.
- 106.) Yende S, Quasney MW, Tolley E, Zhang Q, Wunderink RG. Association of tumor necrosis factor gene polymorphisms and prolonged mechanical ventilation after coronary artery bypass surgery. *Crit Care Med*. 2003 Jan;31(1):133-40.
- 107.) Yu J, Xiao YB, Wang XY. Effects of preoperatively selected gut decontamination on cardiopulmonary bypass-induced endotoxemia. *Chin J Traumatol*. 2007 Jun;10(3):131-7.
- 108.) Ziegeler S, Raddatz A, Hoff G, Buchinger H, Bauer I, Stockhausen A, Sasse H, Sandmann I, Hörsch S, Rensing H. Antibiotics modulate the stimulated cytokine response to endotoxin in a human ex vivo, in vitro model. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006 Oct;50(9):1103-10. Epub 2006 Aug 25.
- 109.) Ziegenfuss T, Wanner GA, Grass C, Bauer I, Schüder G, Kleinschmidt S, Menger MD, Bauer M. Mixed agonistic-antagonistic cytokine response in whole blood from patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Intensive Care Med*. 1999 Mar;25(3):279-87.

## **7. DANK**

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar (Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. R. Larsen) in Zusammenarbeit mit der Klinik für Thorax und Herz-Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.J. Schäfers) durchgeführt.

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich bei der Fertigstellung auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hauke Rensing, danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, verschiedene eigene Idee in den Räumen des Labors für experimentelle Anästhesie auszuprobieren.

Herrn Dr. med. Stephan Ziegeler möchte ich für die gute Betreuung und die Hilfe bei der praktischen Durchführung, vor allem bei der Betreuung der Studienpatienten bedanken. Außerdem danke ich für die Korrekturen und den geduldigen Schriftverkehr, der für die Fertigstellung der Arbeit in den letzten Jahren nötig war.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Beate Wolf die mich im Labor für experimentelle Anästhesie ausgezeichnet unterstützt hat, die mich auch in Zeiten in denen nichts vorwärts zu gehen schien immer wieder aufgebaut hat und mit neuen Ideen schon fast verloren geglaubte Experimente doch noch zu einem guten Ende hat kommen lassen. Ohne sie wäre der experimentelle Teil dieser Arbeit wohl nie zustande gekommen.



**8. LEBENSLAUF****Sebastian Allgäuer**

Geburtsdatum/-ort: 19.08.1979 in Ostfildern – Ruit  
Eltern: Elisabeth und Dieter Allgäuer  
Adresse: Kronenstr. 34; 70771 Leinfelden - Echterdingen

**Schulbildung und Hochschulstudium**

1986 – 1999 Freie Waldorfschule Uhlandshöhe, Stuttgart  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
07/1999 – 04/2000 Wehrdienst als Sanitätssoldat beim 1./Gebirgsartilleriebatallion 225, Füssen  
10/2000 – 04/2007 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
09/2002 Physikum  
08/2003 1. Staatsexamen  
03/2006 2. Staatsexamen  
04/2007 3. Staatsexamen  
07/2007 Approbation als Arzt

**Praktisches Jahr:**

04/2006 – 06/2006 Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin der Universität des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. M. Böhm  
06/2006 – 08/2006 Klinik für Innere Medizin IV – Nieren und Hochdruckkrankheiten der Universität des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. H. Köhler  
08/2006 – 12/2006 Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie im Kantonsspital Liestal, Schweiz – PD Dr. C.A. Maurer  
12/2006 – 03/2007 Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. M. Stöckle

**Beruflicher Werdegang**

09/2007 - 10/2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Gastroenterologie am Städtischen Krankenhaus in Pirmasens. CA Dr. C. Moser

seit 11/2010                      Assistenzarzt im Zentrum für Notfallmedizin. Abteilung für Nephrologie  
und allgemeine Innere Medizin am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart.  
Prof. Dr. med. M.D. Alscher

Publikationen, Vorträge, Poster

- B. Lehnert, U. Geisthoff, S. Allgäuer, Th. Verse: Extrakorporale piezoelektrische Stoßwellenlithotripsie von Speichelsteinen mit einem neuen Wandler  
77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie; Mannheim, Mai 2006
- Geisthoff U, Allgäuer S, Lehnert B, Verse T: A new extracorporal lithotripter used for sialolithiasis  
Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation; Toronto/Canada, August 2006
- Ziegeler S, Allgäuer S, Schmitz J, Bauer M: Einfluss eines TNF- $\beta$  und eines IL-10 Polymorphismus auf die myokardiale Schädigung nach extrakorporaler Zirkulation  
Deutscher Anästhesiekongress (DAC); Nürnberg, 2004
- Allgäuer S, Mullen M, Funda J, Moser : Indikationen und Komplikationen der endoskopischen Einlage selbstexpandierender Metallstents – Eine Übersicht aus dem Jahr 2008 bei 10 Patienten.  
53. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft; Neustadt/Weinstraße; März 2009
- Allgäuer S, Foitzik E, Funda J, Vieth M, Moser C: Reaktivierung einer Varizella-Zoster Infektion als seltene Ursache einer Ösophagitis  
23. Jahrestagung der Gastroenterologischen Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz/Saarland (GARPS); Bad Kreuznach; Oktober 2009
- Allgäuer S, Mullen M, Funda J, Jakob B, Moser C: Reinterventionen bei selbstexpandierenden Metallstents (SEMS) – Eine Übersicht über 30 SEMS im Gastrointestinaltrakt  
54. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft; Neustadt/Weinstraße; März 2010